

**Die Wirkung von Röntgenstrahlen, Trenimon und
Natriumfluorid auf reife Spermien von Phryne cincta.
Untersuchungen zum Einfluß der Chromosomenstruktur
auf die Rate chromosomaler Aberrationen.**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
vorgelegt dem Fachbereich Biologie
der Freien Universität Berlin**
—

von
Dipl. Biol. Norbert Israelewski
—
aus Uelzen / Niedersachsen

1977
—

**Die Wirkung von Röntgenstrahlen, Trenimon und
Natriumfluorid auf reife Spermien von *Phryne cincta*.
Untersuchungen zum Einfluß der Chromosomenstruktur
auf die Rate chromosomaler Aberrationen.**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
vorgelegt dem Fachbereich Biologie
der Freien Universität Berlin

von

Dipl. Biol. Norbert Israelewski

aus Uelzen / Niedersachsen



Erster Referent:

Prof. Dr. G. Obe

Zweiter Referent:

Prof. Dr. K. Sperling

Tag der Promotion:

4.7.1977

ÜBERSICHT

EINLEITUNG	4
MATERIAL UND METHODE	16
ERGEBNISSE	25
DISKUSSION	120
ZUSAMMENFASSUNG	151
LITERATUR	153
TABELLEN	169

Einleitung

Die DNS als Träger der Erbinformation zeichnet sich durch zwei Grundeigenschaften aus. Zum einen besitzt sie eine konservative Funktion, die in der Fähigkeit zur semi-konservativen Replikation (Taylor 1957; Meselson und Stahl 1958) zum Ausdruck kommt. Diese Funktion muß als notwendige Voraussetzung für die Weitergabe des Erbgutes an Tochtergenerationen und damit für die Erhaltung des Lebens angesehen werden. Zum anderen aber muß eine absolute, genetische Stabilität zwangsläufig zum Konflikt mit den Erfordernissen einer sich ständig wandelnden Umwelt mit den verschiedenartigsten Habitaten führen. Daraus ergibt sich eine weitere, progressive Funktion der DNS. Als lineares Polymerisationsprodukt aus nur 4 verschiedenen Nukleotiden und mit der Festlegung der genetischen Information in einer bestimmten Basensequenz ist sie entsprechend ihrem inneren Aufbau zu fast beliebig vielen qualitativen und quantitativen Veränderungen des Informationsgehaltes befähigt.

Veränderungen des Erbgutes, Mutationen, können auf 3 verschiedenen Ebenen der Informationsspeicherung eintreten, je nachdem ob das Gen, das Chromosom oder das Genom von der Änderung betroffen ist.

Auf der Ebene des Gens kann die chemische Veränderung einer Base, die Substitution einer Base durch eine andere oder durch ein Basenanalogon einen Austausch einer Aminosäure in einer Polypeptidkette bewirken (Wolstenholme 1969). Neben diesen Punktmutationen im Sinne des Wortes führen hauptsächlich kleinere oder größere Deletionen im Bereich einer Basensequenz (Blockmutationen) zu Genmutationen (Übersicht: Drake 1970; Benzer 1961; Nomura und Benzer 1961).

Auf der Ebene des Chromosoms können ganze Genblöcke intrachromosomal (Inversionen, Shifts) oder interchromosomal (Translokationen, Transpositionen) neu kombiniert werden. Eine quantitative Veränderung ist durch Verlust oder Verdopplung (Deletion, Duplikation) eines Chromosomensegments möglich (Übersicht: Rieger und Michaelis 1967). Eine Chromosomenmutation muß nicht notwendigerweise eine Genmutation im Bereich einer Bruchstelle einschließen. Allein die veränderte Lage der ansonsten unveränderten Gene oder der Zusammenschluß zu neuen Kopplungsgruppen können eine geänderte Koordination der Funktionsabläufe bewirken (Sturtevant 1925; Hannah 1951; Becker 1961; Lima-de-Faria 1976 a; 1976 b).

Schließlich kann auf der Ebene des Genoms ein ganzes Chromosom verlorengehen oder hinzugefügt werden (Aneuploidie). Eine Verdoppelung oder Vervielfachung des ganzen Chromosomensatzes (Polyploidie) hat, wie die Aneuploidien, bei tierischen Organismen fast immer schwerwiegende Disharmonien in der genetischen Balance zur Folge, die sich in der Regel als dominante Letalfaktoren manifestieren (Übersicht: Rieger 1963).

Ähnlich schädliche Auswirkungen haben strukturelle Chromosomenmutationen, obwohl balancierte Chromosomenmutationen keine oder nur geringfügige und in speziellen Fällen sogar positive Konsequenzen nach sich ziehen können (vgl. Dobzhansky 1951). Im allgemeinen jedoch sind unbalancierte Chromosomenmutationen, neben Genommutationen, überwiegend für die dominante Letalität bei Drosophila, der Maus und beim Menschen verantwortlich (Muller 1954; Hadorn 1961; Russel 1965; Traut 1968). Von den Aberrationstypen, die mit dem Verlust eines Chromosomensegments einhergehen, wird der größte Teil bereits

während der Furchungsteilungen oder im Verlauf der Embryogenese eliminiert (Lachange und Riemann 1964; Basler et al. 1976).

Die balancierten Mutationen werden in der Regel der Selektion unterliegen. Nur wenige können im Rahmen des chromosomalen Polymorphismus der Art erhalten bleiben oder unter besonderen Bedingungen sogar zur Entstehung einer neuen Art Anlaß geben (White 1969; Lüers et al. 1974).

Weitaus langsamer wirkt das Selektionssystem auf rezessive Genmutationen, die erst nach mehreren oder vielen Generationen homozygot werden und erst dann selektioniert werden können. Neben Chromosomenaberrationen entstehen aber auch immer Genmutationen, so daß eine strukturelle Veränderung als Indikator für ebenfalls aufgetretene Genmutationen verwendet werden kann. Genmutationen entstehen jedoch häufiger als Chromosomenaberrationen. Außerdem ändert sich das Verhältnis der Häufigkeiten von Gen- und Chromosomenmutationen nach Behandlung mit verschiedenen Mutagenen. Ein negatives Ergebnis der Strukturanalyse sagt deshalb nichts über die Häufigkeit von induzierten Genmutationen aus.

Spontane Mutationen erlauben den Organismen, dem Wandel von ökologischen Verhältnissen zu begegnen. Mutationen sind aber unter stabilen Umweltbedingungen eine Belastung für die Population.

Der Preis für die Fixierung des Gleichgewichts zwischen Variabilität und Stabilität ergibt sich aus der natürlichen Selektion, die schlecht angepasste Individuen aus der Population eliminiert (Haldane 1957). Selbst bei drastischer, artifizieller Erhöhung der Mutationsrate erweist sich dieses System als flexibel genug, um den Gleichgewichtszustand durch kompensierende Mutationen

und Selektion aufrechtzuerhalten (Sankaranarayanan 1964; Nöthel 1970).

Der Mensch hat in den letzten Jahrzehnten damit begonnen, das Gleichgewicht zwischen Mutation und Selektion auf zwei Wegen zu beeinflussen. Mit der industriellen Aktivität und den therapeutischen Anwendungen ist zum einen eine erhöhte Belastung durch physikalische und chemische Mutagene verbunden, zum anderen wird durch medizinische und hygienische Maßnahmen die Effektivität der natürlichen Selektion gegen gefährliche Neumutationen in vielen menschlichen Populationen reduziert (Drake et al. 1975). Werden jedoch die Ergebnisse der Strahlenbelastung einer Population von Drosophila auf menschliche Populationen übertragen, dann ist eine absolute, existentielle Gefährdung des Menschen nicht gegeben (Sperlich 1973). Die Belastung des Menschen durch Mutagene ergibt sich vielmehr aus der Erhöhung der genetischen Bürde, die zum Teil als Erbleiden jeder Art sichtbar wird und aus der ethischen Verantwortung des Menschen gegenüber dem Schicksal des betroffenen Individuums.

Es ist seit langem bekannt, daß Röntgenstrahlen Gen-, Chromosomen- und Genommutationen auslösen können (Muller 1927; Altenburg 1928; Stadler 1928). Dagegen sind die bisher bekannten Mechanismen und deren Interaktionen, die zu Mutationen führen, nur schwierig in ein generelles Schema der Aberrationsentstehung einzuordnen (Wolff 1961; Evans 1962). Bereits die ersten Analysen strahleninduzierter Chromosomenaberrationen ließen erkennen, daß Mutationen als Folge eines fehlerhaften Reparaturvorgangs entstehen (Stadler 1932; Bauer 1939; 1942; Sax 1940; Lea 1947).

Mit der Entdeckung von zwei enzymatischen Reparatursystemen, die auf dem Einstrang-Niveau Schäden beheben und ein weiteres, das während der Replikation wirksam ist (Hanawalt 1972), schien die Lösung der Frage nach der Entstehung von Chromosomenaberrationen kurz bevorzustehen. Es zeigte sich jedoch, daß mit den verschiedenen Wirkungsweisen der energieabhängigen Reparatursysteme, zu den bereits bestehenden, ungelösten Fragen noch weitere hinzugekommen sind.

Die Schwierigkeiten, die durch den Einfluß des Mutagens auf Repairenzyme entstehen, lassen sich bei Bestrahlung reifer Spermien vollständig ausschalten, denn die Reparatur induzierter Läsionen in Spermien erfolgt erst nach der Befruchtung in der Zygote (Muller 1940). Jedoch muß bei jeder Untersuchungsmethode ein mehr oder weniger langer Zeitraum, zwischen der Induktion von Läsionen, der Entstehung und Beobachtung von Aberrationen, in Kauf genommen werden, so daß eine Vielzahl von sekundären Reaktionsschritten die Beurteilung von primären Ereignissen erschweren.

Als Primäreignis wird nach Röntgenbestrahlung ein Bruch in einem oder beiden Strängen der DNS angesehen, wobei nach Bender et al. (1974) hauptsächlich durch Doppelstrangbrüche eine Verheilung von verschiedenen Bruchenden möglich ist. Nach diesem Modell der Chromosomenaberrationsentstehung können sowohl vor (Excision Repair) als auch während oder nach der Replikation (Post-Replikation Repair) Chromosomenmutationen entstehen. Dagegen folgerten Wolff und Cleaver (1973) und Painter und Wolff (1973), die bei Pflanzen kein Excision Repair nachweisen konnten, daß "alle Hypothesen zur Chromosomenmutationsentstehung, die mehr oder weniger auf Modelle mit

Excision Repair als Grundlage für die Reparatur der schadhafte DNS hinweisen, eine Überprüfung erfordern".

Revell (1955; 1966) und Fox (1966 a; 1966 b) wiederum vermuten nicht im Bruchereignis, sondern in noch nicht näher definierbaren "labilen Zuständen", die nicht die Kontinuität des Chromosoms zerstören, die primäre Schädigung der DNS. Diese Läsionen können entweder repariert werden oder bei Kontaktaufnahmen mit einer anderen einen dem Crossing Over ähnlichen Austauschprozeß einleiten.

Die beiden unterschiedlichen Auffassungen, ob eine Primärläsion als aktueller oder potentieller Bruch (Bauer 1939; Thoday 1953) anzusehen ist, verlieren an Gegensätzlichkeit, wenn berücksichtigt wird, daß die chromosomale Proteinhülle als Schiene für die gebrochene DNS-Helix wirken kann (Baker 1971). Damit bleibt, trotz eines aktuellen Bruchs in der DNS, die Kontinuität des Chromosoms bewahrt.

Die natürliche Belastung einer Population durch ionisierende Strahlung ist weitgehend von der jeweiligen reproduktiven Lebenszeitspanne des Individuums abhängig. Bei Drosophila wird dieser Einfluß auf die Gesamtmutationsrate auf etwa 1 zu 1000 geschätzt (Hertwig 1959), während bei langlebigen Organismen (Mensch) etwa 10 %, und bei extrem langlebigen (Reptilien) möglicherweise der größte Teil der Gesamtmutabilität durch die natürliche Strahlung bedingt ist (Crow 1970). Trotz der extrem unterschiedlichen Lebensspannen ist die Gesamtmutationsrate pro Generation beim Menschen mit der bei Drosophila vergleichbar. Allgemein variieren die Gesamtmutationsraten pro Generation bei Eukaryonten mit unterschiedlichen Lebensspannen weniger, als aus dem Einfluß

der natürlichen Strahlung zu erwarten wäre.

Der geringe Einfluß der natürlichen Strahlung auf die Gesamtmutationsrate kann schließlich nur bedeuten, daß die Entstehung von Primärläsionen oder Mutationen durch im einzelnen unbekannte Faktoren erleichtert, bzw. erschwert werden kann, wobei die Gesamtmutationsrate mit der Lebenszeit in Einklang gebracht wird. Das heißt auch, daß der Motor der Evolution selbst der Evolution unterliegt (Crow 1970).

In Anbetracht dieser Situation muß davon ausgegangen werden, daß Eukaryonten über Mechanismen verfügen, die nicht nur den mutagenen Einfluß von Röntgenstrahlen, sondern auch den von chemischen Substanzen regulieren.

Zu der bisher am genauesten untersuchten Gruppe der "Radiomimetika" zählen die alkylierenden Substanzen, die in der DNS bevorzugt einen Alkylrest auf das N-7-Atom des Guanins übertragen (Wheeler 1962). Aus experimentellen Befunden bei Drosophila und beim Menschen kann vermutet werden, daß als Vorbedingung für eine Chromosomenaberration eine Doppelstrang-Alkylierung (Crosslink) der DNS notwendig ist. Dem entspricht, daß durch monofunktionelle Alkylantien weitaus weniger Chromosomenaberrationen induziert werden können als durch solche mit mehreren funktionellen Gruppen (Lüers und Röhrborn 1965). Die chromosomenbrechende Wirkung ist darüber hinaus nicht nur mit der Anzahl der reaktiven Gruppen positiv korreliert, sondern vor allem mit der Fähigkeit, intra- oder interchromosomale Vernetzungen der DNS-Stränge durch kovalente Bindungen herbeiführen zu können (Obe 1968). Daneben beeinflusst auch die Struktur des Grundkörpers die Crosslink-Reaktion (Lüers und

Röhrborn 1965). Der wesentlichste Unterschied zwischen Alkylantien und Röntgenstrahlen besteht in der Natur der induzierten Primärläsion. Während bei der Bestrahlung direkt oder indirekt durch Radikale des Wassers (Dertinger und Jung 1969) Brüche in der DNS induziert werden, die als Trigger für das Excision Repair System dienen (Setlow et al. 1969; Cleaver 1969), können Crosslinks in der DNS erst während oder nach der Replikation aufgelöst werden. Im Fall eines Misrepairs ist dann nicht das Chromosom, sondern die Chromatide die Mutationseinheit (Evans und Scott 1963; Heiner 1971).

Eine weitere Möglichkeit der Aberrationsentstehung durch Einstrang-Alkylierung der DNS im Zusammenhang mit der Wirkung einer Endonuklease (Bender et al. 1974) wurde bereits von Natarajan (1976) kritisiert und soll hier deshalb nicht weiter erörtert werden.

In jedem Fall jedoch ist die Ursache für eine Änderung der Mutationsrate, in verschiedenen Stadien des Zellzyklus oder Organismen nach Behandlung mit Chemomutagenen oder mit Röntgenstrahlen, nur schwierig zu erklären. Ausgehend von Untersuchungen Repair-defekter, bzw. -geschädigter Zelllinien des Menschen, der Maus sowie von Bakterien und Pilzen, wurde stets auf die Korrelation zwischen Repairkapazität oder Zellstoffwechsel einer Zelle und der Mutationsrate hingewiesen.

Im Hinblick auf Beobachtungen zur Kinetik der Reparatursysteme erscheint aber in "normalen" Zellen die Repairkapazität selbst bei extremer Mutationsbelastung ausreichend. So können embryonale Maus-Fibroblasten bis zu 100 % der induzierten Thymindimere eliminieren (Ben-Ishai und Peleg 1975). Rieger und Michaelis (1967)

schätzen die Restitutionsrate strahleninduzierter Brüche auf 90 - 99 %. Selbst nach Applikation von 50 KR Gamma-Strahlen werden in Hamsterzellen 80 - 100 % der induzierten Doppelstrangbrüche innerhalb von 30 Minuten repariert (Corry und Cole 1973), wobei noch ungeklärt ist, welcher Reparaturmechanismus dafür verantwortlich ist.

Aufgrund der Wirkungsweise von alkylierenden Substanzen müssen bei der Induktion von Primärläsionen die sterischen Gegebenheiten, die das Mutagen selbst oder die Chromosomen im Zellkern betreffen, mehr beachtet werden als nach Röntgenbestrahlung. Eine Variation in der qualitativen und quantitativen Zusammensetzung strukturbestimmender Proteine könnte darüber entscheiden, in welchem Ausmaß die DNS durch Alkylierungen geschädigt werden kann. Es ist bekannt, daß insbesondere die freien NH_2 -Gruppen der Aminosäuren Arginin und Lysin häufig von Alkylierungen betroffen werden (Sega et al. 1974), wodurch ein gewisser Schutz für die DNS erreicht wird.

Einen Hinweis auf die Bedeutung der Chromosomenstruktur in der Chemomutagenese erhielten Israelewski und Obe (1977) nach Behandlung reifer Spermien von Phryne cincta mit dem trifunktionellen Alkylans Trenimon und mit der Kombination Trenimon und Natriumfluorid.

Natriumfluorid senkt in Kombination mit polyfunktionellen Alkylantien die chromosomale Aberrationsrate (Obe und Slacik-Erben 1973; Büchi und Bürki 1975; Slacik-Erben und Obe 1976), dagegen übt es in Kombination mit monofunktionellen Substanzen (Vogel 1973) oder mit Röntgenstrahlen (Brandt 1975) keine Schutzwirkung aus.

Die Schutzwirkung des Natriumfluorids ist somit sicherlich anders zu bewerten als die Wirkungsweise bekannter Radioprotektoren, die strahleninduzierte Radikale abfangen können (Gebhard 1974). Da Natriumfluorid auf eine Reihe von Enzymen der Glycolyse und der Atmungskette sowie auf die DNS-Polymeraseaktivität hemmend wirkt (Zusammenstellung bei: Slacik-Erben 1976), ist eine Beeinträchtigung der Repairkapazitäten zu erwarten.

Demgegenüber fanden Büchi und Bürki (1975) und Mendelson (1976) nach Behandlung von Drosophila-Weibchen mit Natriumfluorid keine Beeinflussung der Repairaktivitäten in Zygoten mit geschädigten, väterlichen Chromosomen.

Inwieweit die Schutzwirkung des Natriumfluorids mit einer Erniedrigung der Induktionswahrscheinlichkeit von Primärläsion erklärbar ist, und ob die Chromosomenstruktur dabei eine Rolle spielen kann, soll in der vorliegenden Arbeit diskutiert werden.

Die Bedeutung der räumlichen Organisation des Chromatins im Zellkern für die Entstehung von Chromosomenaberrationen wurde bereits in einer Reihe von Arbeiten hervorgehoben (Bauer 1939; Glass 1955; Keyl 1958). Ahnström und Natarajan (1971), Holmberg (1976) und Beek und Obe (1977) weisen darauf hin, daß mit einer Änderung in der Chromosomenorganisation auch die Strahlensensitivität der Zelle verändert wird.

Zur Untersuchung dieser Zusammenhänge und für die Klassifizierung der Mutationstypen ist es notwendig, ein Testsystem zu wählen, das die Erfassung von intrachromosomalen Aberrationen ebenso zuläßt, wie die von interchromosomalen Aberrationen. Die Riesenchromosomen der

Dipteren bieten sich hierfür an, denn selbst intrachromosomale Umlagerungen im Bereich von nur wenigen Genen können noch sicher erkannt werden.

Eine Analyse der strukturellen Veränderungen in den Speicheldrüsen von Drosophila melanogaster nach Bestrahlung von Spermien ergab ein Mutationsspektrum, das bei zufälliger Lage weitgehend entspiralisierter Chromosomen im Pronukleus zu erwarten ist (Bauer 1939). Demgegenüber unterscheidet sich das in Spermien induzierte Mutationsspektrum der strahlenempfindlicheren Phryne cincta gegenüber Drosophila melanogaster durch einen wesentlich größeren Anteil intrachromosomaler Aberrationen (Israelewski 1974; 1975). Die aus diesem Vergleich abgeleitete Korrelation zwischen Chromosomenstruktur und Strahlensensitivität zeichnet sich somit, im Zusammenhang mit den bereits erwähnten Untersuchungen an menschlichen und pflanzlichen Chromosomen, mehr als ein generelles als ein spezielles Phänomen ab.

Die folgenden Ergebnisse sprechen darüber hinaus dafür, daß hauptsächlich eine Änderung in der Chromosomenstruktur den Empfindlichkeitsunterschied zwischen Drosophila und Phryne hervorruft. Ferner soll in dieser Arbeit untersucht werden, ob der Strahlensensitivitätsunterschied zwischen dem bs- und as-Stamm von Phryne cincta ebenfalls mit einer Änderung in der Chromosomenstruktur einhergeht.

Der as-Stamm zeichnet sich gegenüber dem bs-Stamm durch eine generell erhöhte Crossing Over-Frequenz aus, die mit zwei heterochromatischen Blöcken im X_B -Chromosom verbunden ist (Wolf 1963). Allgemein wird vermutet, daß zur Reparatur der schadhafte DNS und zum Rekombi-

nationsvorgang teilweise identische Enzymsysteme benötigt werden (Watson 1968; 1971). Unterschiedliche, chromosomale Aberrationsraten könnten demzufolge auch auf eine Erhöhung oder Erniedrigung der Repairaktivitäten in den Zygoten beider Stämme zurückgeführt werden.

Material und Methoden

1. Karte der Polytänchromosomen; Heterochromatinlokalisation in den Mitosechromosomen

Die bisher benutzte Karte (Israelewski 1974) wurde als Grundlage für die vorliegende verbesserte Abbildung der Polytänchromosomen von Phryne cincta verwendet. Die Speicheldrüsenchromosomen wurden im Maßstab von ca. 1 : 4500 vergrößert, das entspricht einer Vergrößerung des Chromosoms 3 von 248 μm auf etwa 1,2 m. Die Abschnittseinteilung wurde bis auf Chromosom 3, das um eine Abschnittslänge gedehnt wurde, weitgehend beibehalten. Anhand ausgewählter Präparate konnten nach lichtmikroskopischer Vorlage bei der Vergrößerung 100 x 12 (Leitz, Dialux) gegenüber der alten Karte die gezeichnete Bandenanzahl auf etwa das 3fache erhöht werden. Anschließend wurden die Karten fotografiert und auf DIN A4 Format verkleinert.

Zur Lokalisation heterochromatischer Bereiche in den Mitose- oder Speicheldrüsenchromosomen wurden verschiedene Methoden angewandt.

a) Fluoreszenzfärbung der Mitose- und Riesenchromosomen mit Quinacrine Mustard nach Adkisson et al. (1971)
Ovarien, bzw. Speicheldrüsen aus verpuppungsreifen Larven des as- und bs-Stammes von Phryne cincta wurden in Ringerlösung (0,9% NaCl) präpariert, in 45%iger Essigsäure 3 Minuten fixiert und auf Gelatine-Chromalaun vorbehandelte Objektträger in 45%iger Essigsäure unter einem silikonisierten Deckglas leicht gequetscht. Nach Einfrieren des Objekts auf Trockeneis und Absprengen der Deckgläser konnten die Präparate in absolutem Alko-

hol bei 4° C gelagert werden. Zur Weiterverarbeitung wurden die Präparate in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert und vor der Färbung in einem Di-Natriumhydrogenphosphat/Zitronensäure Puffer bei pH 4 gespült. Im gleichen Puffer erfolgte die Färbung mit Quinacrine Mustard bei einer Konzentration von 50 µg/ml für 20 Minuten bei Raumtemperatur. Danach wurde nochmals in Pufferlösung gespült und zur Auswertung mit einem Leitz Fluoreszenzmikroskop ein Deckglas aufgelegt.

b) Fluoreszenzfärbung der Mitose- und Riesenchromosomen mit Hoechst 33258

Die Präparation, Fixierung, das Quetschen und Ab Sprengen erfolgte wie oben beschrieben. Darauf wurden die Präparate luftgetrocknet. Die Färbung wurde nach Gatti et al. (1976) vorgenommen. Dazu wurden die Präparate 5 Minuten rehydriert in 0,15 M NaCl - 0,03 M KCl - 0,01 M Phosphatpuffer (pH 7). Die Färbezeit betrug etwa 10 Minuten bei einer Hoechst 33258 Konzentration von 0,5 µg/ml Pufferlösung. Nach Spülen in Pufferlösung wurde in Na-Phosphat/Na-Citrat Puffer, pH 7, eingedeckt.

c) C-Bandenfärbung der Mitosechromosomen nach Hsu (1971)

Ovarien aus bs- und as-Tieren wurden, wie oben beschrieben, präpariert, mit 50%iger Essigsäure 10 Minuten unter dem Deckglas fixiert, leicht gequetscht und das Deckglas nach Einfrieren auf Trockeneis abgesprengt. Nach zweimaligem Waschen mit 95% Alkohol wurden die Präparate luftgetrocknet, in einer 2 x SSC Lösung, eingestellt mit NaOH auf pH 12, 1 Minute denaturiert und in 3 Küvetten mit 2 x SSC gespült. Die Renaturierung erfolgte 20 - 24 Stunden in 6 x SSC bei 65° C. Die jeweiligen SSC-Konzentrationen wurden durch Verdünnen einer

10 x SSC-Lösung hergestellt (1,5 M NaCl; 0,15 M Na-Citrat; pH 7). Auf die Renaturierung folgte ein jeweils zweimaliges Spülen in 70% Alkohol und in 95% Alkohol. Die Färbezeit betrug bei luftgetrockneten Präparaten 15 - 30 Minuten bei einer Verdünnung der Giemsa-Stamm-lösung mit Phosphat-Puffer (pH 7) im Verhältnis 1 : 10. Nach Lufttrocknung wurde in Eukitt eingebettet.

2. Spermiohistogenese; Lokalisation der Kinetochor-be-reiche in den Spermatozoen; (bs-Stamm)

Die Präparation von Testes aus 2 Monate alten Larven bei 20° C Aufzuchttemperatur und aus verpuppungsreifen Larven erfolgte in Ringerlösung, darauf die Fixierung in Alkohol-Eisessig 3 : 1; 3 Sekunden, und die Färbung in 1% Orcein-Essigsäure, 3 - 5 Minuten. Nach Auflegen des Deckglases wurde vorsichtig in 45% Essigsäure gequetscht.

Zur Kinetochordarstellung in den Spermatozoen wurden die Testes und anhängende Speicherorgane aus Imagines in Ringerlösung präpariert, fixiert in Alkohol-Eisessig 3 : 1; 5 Sekunden, gequetscht in 45% Essigsäure. Nach Absprenge des Deckglases und Lufttrocknung wurde nach zwei Methoden weitergearbeitet:

a) Denaturierung mit 5% Bariumhydroxid x 8 H₂O bei 50° C, 5 Minuten (Sumner 1972); mehrmaliges Waschen in Aqua dest.; Inkubation in 2 x SSC bei 60° C, 1 Stunde; mehrmaliges Spülen in Aqua dest.; Lufttrocknung; Färbung mit Giemsa 1 : 10 in Phosphat-Puffer (pH 7), 0,5 - 1 Minute; Spülung in Aqua dest.; Lufttrocknung; Einbettung in Eukitt.

b) Absteigende Alkoholreihe (100%, 96%, 70%); mehrma-liges Spülen in Aqua dest.; Fluoreszenzfärbung mit

Hoechst 33258, 40 µg/ml Aqua dest., 10 - 15 Minuten; mehrmaliges Spülen in Aqua dest.; Eindecken in Aqua dest.

3. Bestrahlung der Imagines, Aufzucht und Präparation der Larven, Auswertung der Präparate

Die Versuchstiere des bs- und as-Stammes von Phryne cincta wurden bis zur Verpuppung bei 20° C aufgezogen. Abgesammelte männliche Puppen wurden zum Schlüpfen in 10° C gebracht. Zur Bestrahlung kamen 1 - 2 Tage alte Männchen. Die Tiere, deren Nachkommen zur Chromosomenanalyse vorgesehen waren, wurden zu jeweils 5 - 7 in Gelatinekapseln (1 cm³) eingeschlossen. Kleine Löcher an den Enden der Kapseln ermöglichten den Luftaustausch.

Mit einem Müller-RT-100 Gerät wurden bei 100 kV; 8 mA; 1,7 mm Al-Filter; Focusabstand 15 cm, in Vorversuchen drei Bestrahlungsdosen ermittelt, die in beiden Stämmen etwa die gleiche dominante Letalität induzieren. Diese vergleichbaren Dosen betragen beim bs-Stamm 1000, 2000 und 3000 R, beim as-Stamm 750, 1500 und 2250 R.

Für die neuen Versuche mit dem as-Stamm wurde als Maß für die eingestrahlte Dosis zunächst die Rate induzierter dominanter Letalmutationen herangezogen (siehe Punkt 4). Außerdem wurde bei der mittleren Dosis (1500 R) der bereits untersuchte bs-Stamm als positive Kontrolle verwendet. Die Verdoppelung, bzw. Verdreifachung der Dosis wurde durch das Steuergerät eines Simplex-Universaldosimeters vorgegeben.

Jedes bestrahlte Männchen wurde sofort mit einem etwa gleichaltrigen Weibchen des entsprechenden Stammes in ein zylindrisches Zuchtglas (8,5 cm hoch; 3,5 cm Durchmesser) gebracht. Die Eiablage erfolgte dort bei 15° C

auf 1,8% Agar nach etwa 6 Tagen. Mit dem Wechsel des Zuchtglases nach jedem 2. Tag wurde die Ablagezeit allgemein auf 2 Tage begrenzt. Gläser, in denen geschlüpfte Larven zu erkennen waren, erhielten ein Futtergemisch aus feuchten Sägespänen und gekochten Kartoffeln und wurden für 4 - 10 Tage in 10° C, danach in 2° C aufgezogen. Nach etwa einem Monat wurde das kleine Zuchtglas gegen ein größeres mit ca. 11 cm Durchmesser ausgetauscht und weiteres Futter dazugegeben.

Die Larven waren nach 4 - 5 Monaten verpuppungsreif. Während dieser Periode wurden die Larven abgesammelt und präpariert.

Die Präparation der Speicheldrüsen erfolgte in Ringerlösung, die Fixierung mit Alkohol-Eisessig 2 : 1, 3 Sekunden, die Färbung mit 0,5% Orcein-Essigsäure-Milchsäure, 20 Minuten, und das Quetschen in 45% Essigsäure. Die Präparate wurden mit einem kleinen Tropfen Milchsäure versehen und bei 10° C oder 15° C bis zur Analyse aufbewahrt.

Jede Chromosomenaberration wurde nur dann als solche bewertet, wenn sie in mindestens 2 Kernen der betreffenden Speicheldrüse eindeutig nachgewiesen werden konnte. Um außerdem Mosaiktiere erfassen zu können, wurden beide Speicheldrüsen eines Tieres untersucht. Präparate, bei denen eine vollständige Analyse nicht möglich war, wurden nicht in die Auswertung einbezogen. Dieser Fall trat etwa bei 2 % aller ausgewerteten Präparate ein und kann somit als Fehlerquelle ausgeschlossen werden.

4. Dominante Letalität

a) Ein Teil der Gelege bei jeder Bestrahlungsserie wurde für die Bestimmung der induzierten dominanten Letalität vorgesehen. Dazu mußten die in Gelegeballen zu-

sammengeschlossenen Eier in Ringerlösung voneinander getrennt werden. 4 Tage nach Eiablage bei 15° C sind die schlupffreien Embryonen in der durchsichtigen Eihülle anhand der Bewegungen und der typischen morphologischen Merkmale von den weißlich-opak schimmernden, frühletalen Eiern zu unterscheiden. In späteren Stadien abgestorbene Embryonen fallen durch eine disorganisierte Morphologie auf.

b) Die Abhängigkeit der dominanten Letalität von der Dosis wurde nach Bestrahlung des as- und bs-Stammes bei 1000, 2000, 3000 und 4000 R mit einem Philips MG 160 Röntgengerät bei 100 kV; 28 mA; 1,7 mm Al-Filter; Dosisleistung 35,7 R/Sekunde; untersucht. Die Bestrahlung von etwa je 10 Männchen im Alter von 1 - 2 Tagen erfolgte in belüfteten, verschraubbaren Plastikkammern. Die Dosis wurde nach der Zeit appliziert und mit einem Simplex-Universaldosimeter überprüft, wobei die Abweichung der gemessenen Dosis vom Sollwert in jedem Fall weniger als 40 R betrug.

Jedes bestrahlte Männchen wurde entweder mit einem Weibchen des bs- oder as-Stammes verpaart und die Gelege wie beschrieben abgesammelt. Weiterer Untersuchungsgang wie unter a).

c) 1 - 2 Tage alte Männchen des bs-Stammes wurden 40 Minuten mit Sauerstoff oder Stickstoff vorbehandelt. Dazu wurde das entsprechende Gas über eine Waschflasche mit gasgesättigtem Leitungswasser durch die Bestrahlungskammern geleitet. Die Bestrahlungsdosen betrugen bei Sauerstoffvorbehandlung 1000, 2000 und 3000 R, bei Stickstoffvorbehandlung 2000, 3500 und 5000 R. Die Bestrahlung erfolgte, wie unter b) beschrieben, in der entspre-

chenden Atmosphäre (Sauerstoff; Luft; Stickstoff). Jedes bestrahlte Männchen wurde mit einem Weibchen des bs-Stammes verpaart. Weiterer Untersuchungsgang wie unter a).

d) 3 - 5 Tage alte Männchen des bs- und as-Stammes wurden mit Trenimon (2, 3, 5 - Trisäthyleniminobenzochinon - 1,4), Natriumfluorid und mit einer Kombination beider Substanzen, gelöst in 5%iger Sucroslösung, gefüttert. Die Aufnahme der gelösten Substanzen konnte durch einen 48stündigen Aufenthalt der Testtiere bei 15° C in trockenen Zuchtgläsern wesentlich erleichtert werden. Danach wurden die Gläser mit Zellstoffstreifen, die mit der Testsubstanz getränkt waren, versehen. Es wurden nur Tiere analysiert, die innerhalb einer Viertelstunde die Lösung aufnahmen, wobei sich der vordere Teil des Abdomens, mit bloßem Auge erkennbar, aufbläht. Die Tiere durften dann noch weitere 12 Stunden bei 15° C in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre an den Zellstoffstreifen saugen. Die Trenimonkonzentrationen betrugen: 5×10^{-7} , 10^{-6} , 5×10^{-6} , 10^{-5} , 5×10^{-5} , 10^{-4} , 5×10^{-4} , 10^{-3} M und in Kombination mit 10^{-2} M NaF : 10^{-6} , 5×10^{-6} , 10^{-5} , 5×10^{-5} , 10^{-4} , 5×10^{-4} , 10^{-3} M bei bs und 10^{-5} , 5×10^{-5} , 10^{-4} , 10^{-3} M bei as. Die Kontrolltiere erhielten bei gleicher Vor- und Nachbehandlungsweise entweder 5% Sucroslösung oder $5 \cdot 10^{-1}$, 10^{-2} , bzw. 10^{-3} M NaF in 5% Sucroslösung. Die Untersuchung wurde in mehreren Serien durchgeführt. Deshalb wurde eine positive Kontrolle bei 10^{-5} M Trenimon mitgeführt. Jedes behandelte Männchen wurde mit einem Weibchen des entsprechenden Stammes verpaart. Weiterer Untersuchungsgang wie unter a).

5. Trenimon-induzierte Chromosomenaberrationen

Ein Teil der mit 10^{-5} und 5×10^{-5} M Trenimon behandelten as-Tiere wurden zur Chromosomenanalyse der Nachkommen weitergezogen. Nach dem Schlüpfen der Larven wurden diese bei 10° C aufgezogen. Die Präparation der Speicheldrüsen erfolgte nach 2 - 3 Monaten. Männliche Larven wurden bevorzugt abgesammelt. Zur Analyse der Präparate wurde ein Auswertungsschema benutzt, das die Erfassung von Halbseiten- und Anterior-Posterior Mosaiktieren sicherstellte: In jedem Viertel beider Speicheldrüsen wurden die 4 Chromosomen auf strukturelle Aberrationen hin ausgewertet. Eine Aberration wurde nur dann als solche bewertet, wenn sie mindestens in einem Sektor der Speicheldrüse präsent war. Der Ausfall durch unbrauchbare Präparate betrug etwa 1 %.

6. Messung des Windungsumfangs der Spiralen in den Riesenchromosomen

Die Messung wurde an Präparaten des bs- und as-Stammes vorgenommen, die auch zur Analyse der Röntgen- oder Trenimon-induzierten Aberrationen verwendet wurden.

Allgemein treten bei niedrig-polytänen Speicheldrüsenchromosomen deutliche Spiralstrukturen auf. Da die Polytänisierung nicht synchron in allen Zellen einer Speicheldrüse abläuft, sind auch in Speicheldrüsen erwachsener Larven noch zu einem geringen Anteil niedrig-polytäne Zellen aufzufinden. Gemessen wurde nur dann, wenn wenigstens der halbe Chromosomenarm eines Autosoms von der Spiralisierung betroffen war und wenn die Grenzen der spiralisierten Bereiche in der Chromosomenkarte lokalisiert werden konnten. Als Maß für den Windungsumfang diente dann die Länge eines Abschnittes in der

Karte. Eine entsprechende Messung wurde außerdem an Präparaten geschlechtschromosomal hybrider (ab) Weibchen vorgenommen.

7. Bandenmustervergleich zwischen zwei Phryne Arten

Die Präparation von Speicheldrüsen aus Larven des bs-Stammes von Phryne cincta und P. fenestralis erfolgte wie beschrieben. Zur Fotografie mit einem Leitz Diaplan Mikroskop, Leica Kameraaufsatz bei der Vergrößerung 10 x 100, wurden bei beiden Arten nur solche Chromosomen ausgewählt, die sich bei normaler Streckung durch eine gute Querscheibendifferenzierung auszeichneten. Nach dem Zusammensetzen der Abbildungen einzelner Segmente zu vollständigen Chromosomen wurde die Länge eines jeden Chromosoms mit dem relativen Längenanteil in der Chromosomenkarte verglichen. Bei Abweichungen von der geforderten Länge wurde entsprechend nachvergrößert oder verkleinert.

Ergebnisse

1. Karyotypanalysen und Karte der Polytänchromosomen

Die beiden in dieser Untersuchung verwendeten Stämme unterscheiden sich nur im X-Chromosom, das im as-Stamm gegenüber dem bs-Stamm etwa die doppelte Länge aufweist. Die Autosomen beider Stämme können strukturell und genetisch als identisch angesehen werden. Die Synthese des as-Stammes ging von nur einem einzelnen, eingefangenen Weibchen aus, und deren Nachkommen wurden über eine Reihe von Generationen mit dem bereits etablierten bs-Stamm gekreuzt (Wolf 1976, persönliche Mitteilung).

Die Längendifferenz der beiden X-Chromosomentypen in der Mitose muß, nach Analyse der Riesenchromosomen, auf zwei im as-Stamm zusätzlich vorhandene Heterochromatinblöcke im distalen Bereich des X-Chromosoms zurückzuführen sein (siehe Abb. 2 c). Zudem treten noch strukturelle Umbauten im X-Chromosom des as-Typs auf, die sich in den geschlechtschromosomal hybriden Weibchen als 4 Inversionen darstellen (Wolf 1956).

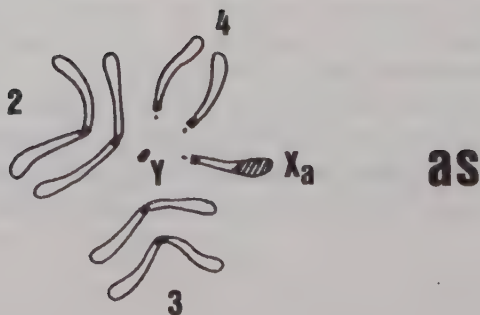
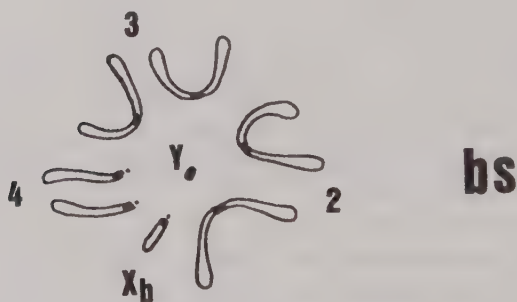
Obwohl sich die beiden zusätzlichen Blöcke im X_a -Chromosom morphologisch, nach den Kriterien von Heitz (1934), als alpha-Heterochromatin darstellen, ist in diesen Bereichen nach Fluoreszenzfärbung der Riesenchromosomen mit Quinacrine Mustard oder Hoechst 33258 keine auffallende Fluoreszenz zu beobachten. Das trifft auch für die heterochromatischen Kinetochorbereiche zu.

Diesem Ergebnis entspricht, daß in den Mitosechromosomen mit den beiden Fluoreszenzfarbstoffen ebenfalls keine Differenzierung in den Kinetochorabschnitten oder in der distalen Hälfte des X_a -Chromosoms erkennbar ist.

Abbildung 1

Männlicher Karyotyp des bs- und as-Stammes von Phryne cincta nach Darstellung der C-Banden.

Die heterochromatischen Abschnitte in den Kinetochorbereichen sind markiert. Die distale Hälfte des X_a -Chromosoms weist nach C-Bandenfärbung ebenfalls eine Markierung auf.



Dagegen heben sich die heterochromatischen Kinetochorbereiche der Metaphasechromosomen nach C-Bandenfärbung durch eine intensive Färbung von den euchromatischen Chromosomenarmen ab (Abb. 1). Die Länge der heterochromatischen Kinetochorbereiche kann in jedem Chromosom als etwa gleich groß angesehen werden. Daraus ergibt sich bei den zweiarmligen Autosomen 2 und 3 ein Heterochromatinanteil an der Gesamtlänge von etwa 5 %, bei dem einarmigen Chromosom 4 etwa 10 %.

Obwohl nur Metaphasen aus Ovarien untersucht wurden (bei den Männchen ist es schwierig, Mitosen darzustellen), wurde in Abb. 1 ein männlicher Karyotyp gezeichnet. Ausgehend von der Situation in den Speicheldrüsenzellen kann angenommen werden, daß das kleine Y-Chromosom, das in beiden Stämmen identisch ist, auch in der mitotischen Metaphase vollständig heterochromatisch ist.

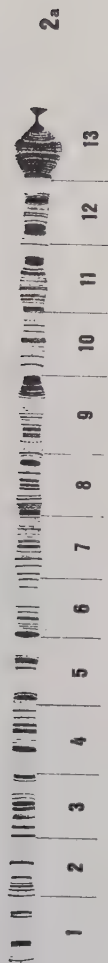
Mit der C-Bandenfärbung wird im X_a -Chromosom nicht nur der Kinetochorbereich, sondern auch die distale Hälfte differenziert (Abb. 1). Die Färbung ist nicht so intensiv wie im Kinetochorenbereich, bestätigt aber die Annahme, daß der Längenunterschied beider X-Chromosomentypen in der Mitose auf die im X_a -Chromosom zusätzlich vorhandenen, heterochromatischen Blöcke zurückzuführen ist.

Zur Erleichterung der Untersuchungen und zur genauen Lokalisation induzierter Chromosomenaberrationen war es notwendig, die vorhandene Karte der Speicheldrüsenchromosomen zu verbessern. In der vorgelegten Karte (Abb. 2 a - c) sind etwa 1700 Banden enthalten. Es wurden nur normal gestreckte Chromosomen gezeichnet; in überdehnten Chromosomen könnte die Anzahl der Banden höher liegen.

Abbildung 2

Karten der Polytänchromosomen aus den Speicheldrüsen-
kernen von Phryne cincta

a) Chromosom 2:		a-Arm, b-Arm
Anzahl der gezeichneten Banden :	265	371
Anzahl der Abschnitte :	13	16
Relative Länge im Genom :	18 %	22 %
K	:	Kinetochor



K

CHR.2



Abbildung 2

b) Chromosom 3:	a-Arm,	b-Arm
Anzahl der gezeichneten Banden :	255	295
Anzahl der Abschnitte :	9	11
Relative Länge im Genom :	12 %	15 %
K :	Kinetocho	



CHR.3



Abbildung 2

c) Chromosom 4, X-Chromosom des bs-Stammes (X_b)
und X-Chromosom des as-Stammes (X_a)

Anzahl der gezeichneten Banden

in Chr. 4	:	368
in Chr. X_b	:	150
in Chr. X_a	:	162

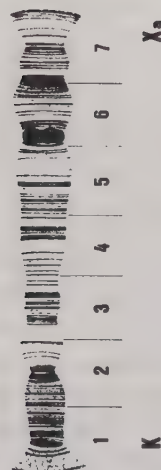
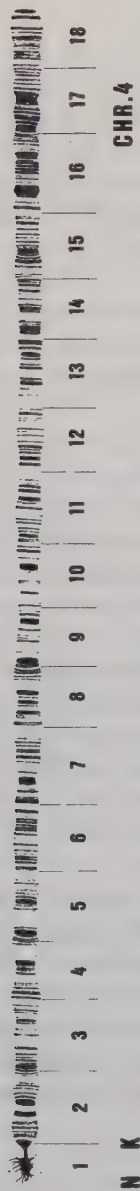
Anzahl der Abschnitte

in Chr. 4	:	18
in Chr. X_b	:	6
in Chr. X_a	:	7

Relative Länge im Genom

Chr. 4	:	24 %
Chr. X_b	:	8 %
Chr. X_a	:	9 %
K	:	Kinetochoor
N	:	Nukleolus- organisator

Das Chromosom X_a besitzt in der distalen Hälfte
zwei alpha-heterochromatische Blöcke.



Beim Vergleich der Bandenanzahl in überdehnten und normal gestreckten Chromosomenabschnitten kann abgeschätzt werden, daß mehr als 50 % aller lichtmikroskopisch sichtbaren Banden in der Karte enthalten sind. Die maximale Bandenanzahl bei Phryne könnte im Bereich von 2000 - 3000 liegen.

2. Zeitlicher Ablauf der Keimzellenbildung im Männchen; Morphologie der postmeiotischen Zellstadien; Lokalisation der Kinetochorbereiche in den Spermatozoen

Die Häufigkeit meiotischer Reifeteilungen I und II in den Testes erreicht im ersten Drittel der Larvalzeit (1,5 - 2 Monate bei 2⁰-Zuchten) ein Maximum. In verpupungsreifen Larven (4 - 5 Monate) sind nur noch vereinzelt Spermatogonien-Mitosen oder Reifeteilungen aufzufinden. Zu diesem Zeitpunkt ist bereits 2/3 des Volumens der Testes mit reifen Spermien gefüllt. Auch nach ein- oder mehrmaliger Kopulation 1 - 4 Tage alter Imagines erfolgt keine Zunahme der vereinzelt auftretenden Spermatogonien-Mitosen oder Reifeteilungen. Diese cytologischen Beobachtungen stimmen mit den praktischen Erfahrungen insoweit überein, als die Männchen nach etwa 6tägiger Verpaarung nicht mehr in der Lage sind, weitere unbegattete Weibchen zu befruchten.

Die Spermiohistogenese in 2 - 3 Monate alten Larven ist in Abb. 3 dargestellt. Nach dem Spermatidenstadium (1) erfolgt eine zunehmende Kondensation der Chromosomen an der Kernmembran, wobei in frühen Stadien (2) stärker gefärbte, oft in enger Nachbarschaft liegende Bereiche auffallen. Mit weiterer Kondensation der DNS und Streckung des Kerns verlieren sich diese Erscheinungen (3).

Das präsumptive Vorder-und Hinterende des Spermiums wird bereits erkennbar (4): die Basis differenziert sich zu einer zweizipfeligen Struktur. In den folgenden Stadien wird das Lumen im Kern mit zunehmendem Kontraktionsgrad der DNS verkleinert (5 - 7). Gleichzeitig zeichnet sich in der Längsachse des Spermiums ein Dichteunterschied zwischen Rand- und Medianzone ab, der auch im reifen Spermium (8) noch gut erkennbar ist.

Entsprechend den Ergebnissen nach Färbung der Kinetochorbereiche in den Mitosechromosomen sind die kinetochornahen Abschnitte auch in den Spermatozoen durch Fluoreszenzfarbstoffe nicht darstellbar, dagegen aber gut mit der C-Bandentechnik. In 84 % aller geprüften Spermien ergibt sich eine bevorzugte Lage der Kinetochore im basalen Drittel des Spermiums. Dabei scheinen die gefärbten Bereiche nicht miteinander fusioniert zu sein. In der Regel sind 2, seltener 3 voneinander abgegrenzte Körper in einem Sektor des Spermiums zu erkennen. In 10 % der Spermien lagen die Kinetochore mehr im mittleren Bereich verteilt und in 6 % im vorderen Drittel. Bei bevorzugt basaler Position der Kinetochore fällt ein einzelner, separat gelegener, färbbarer Körper im vorderen, seltener im mittleren Drittel des Spermiums auf. Da ausschließlich Spermien des bs-Stammes untersucht wurden, dessen Chromosomen sich nur in den Kinetochorbereichen mit der C-Bandentechnik differenzieren lassen, sollte dieser gesondert gelagerte Körper dem Kinetochorbereich eines Chromosoms entsprechen (Abb. 4).

3. Embryonalentwicklung

Die Entwicklung von der befruchteten Eizelle bis zur schlupffreien Larve läuft bei 15° C in einem Zeitraum

Abbildung 3

Morphologie der postmeiotischen Keimzellenstadien von
Phryne cincta.

- 1 : Spermatide
- 2-7 : Stadien der Spermiohistogenese
- 8 : Spermatozoen

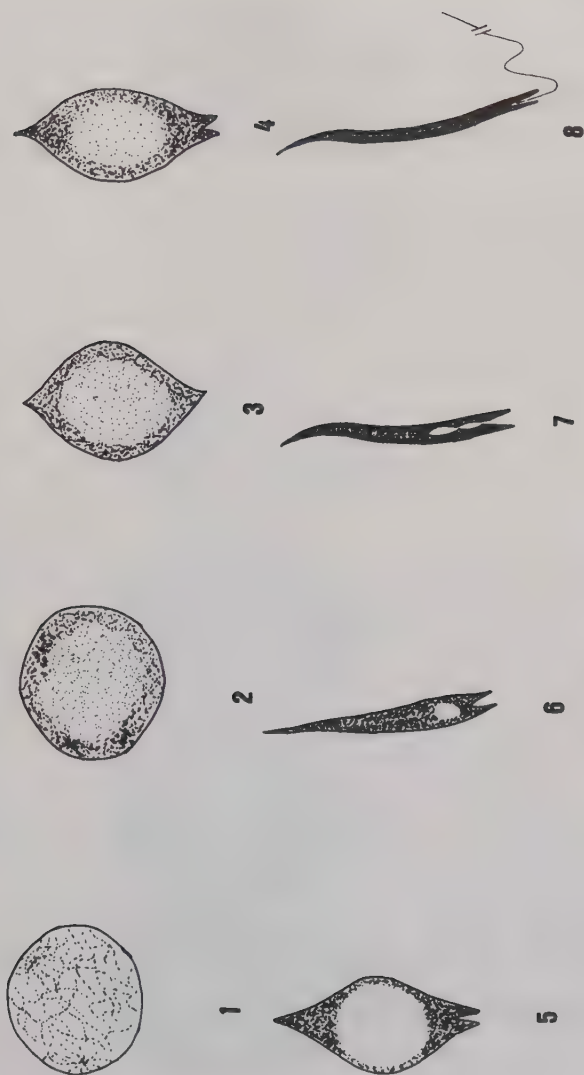


Abbildung 4

Lage der Kinetochorbereiche in den Spermien von
Phryne cincta bs

Anzahl der analysierten Spermien, N = 400

- a) Kinetochore im basalen Drittel
- b) Kinetochore im mittleren Bereich
- c) Kinetochore im vorderen Drittel
- d) Kinetochore im basalen Drittel, ein kleinerer
färbbarer Körper im mittleren Bereich
- e) Kinetochore im basalen Drittel, ein kleinerer
färbbarer Körper im vorderen Drittel

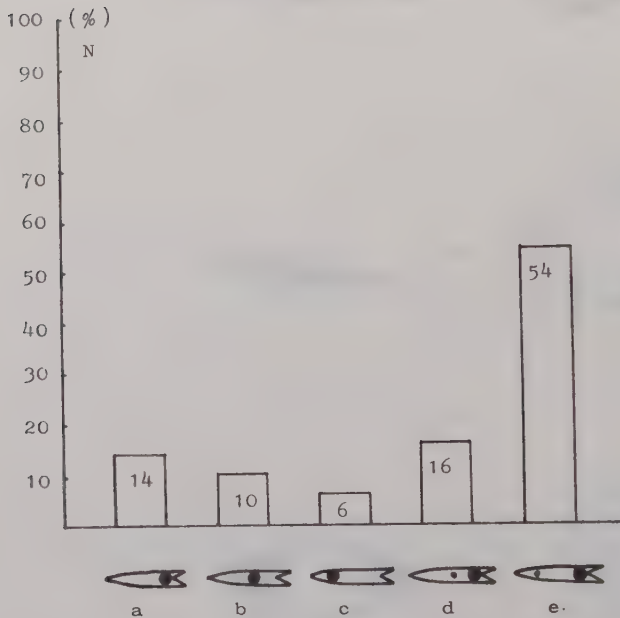
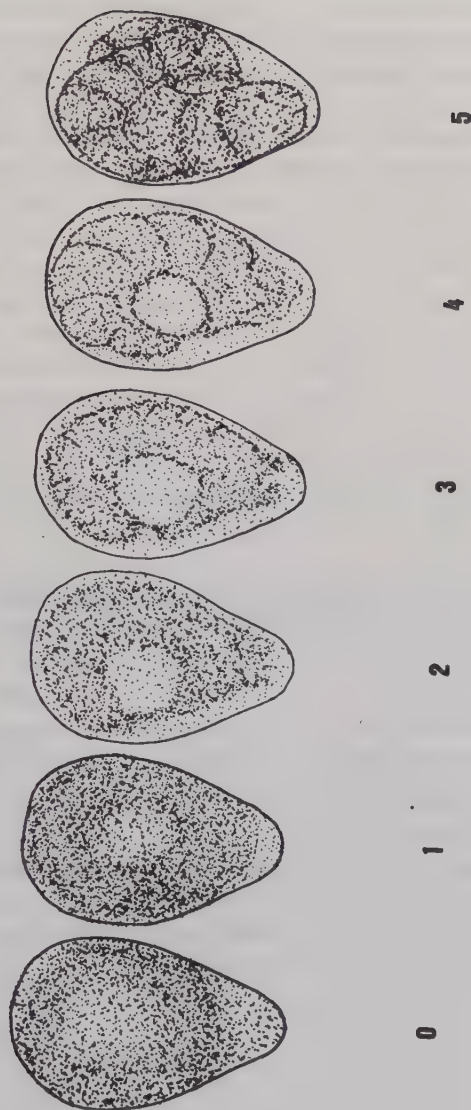


Abbildung 5 Entwicklung der befruchteten Eizelle zur schlupfreifen Larve bei Phryne cincta im Zeitraum von 0 bis 5 Tagen nach der Eiablage bei 15° C.



Tage nach Eiablage

von 5 Tagen ab (Abb. 5). Im Rahmen dieser Untersuchung war es nicht notwendig, die einzelnen Entwicklungsstadien genau zu bestimmen. Ohne besondere Färbemethoden anzuwenden, läßt sich jedoch aus der äußeren Morphologie erkennen, daß das Morula- und Gastrulastadium innerhalb eines Tages durchlaufen werden. Am 2. Tag erfolgt bereits die Bildung der Embryonalhüllen und des Dottersackes. Mit fortschreitender Organogenese ändert sich die Farbe des Eies von weiß zu helltrüb bis durchsichtig am 3. Tag. Dieser deutlich erkennbare Farbumschlag wurde bei der Klassifizierung von früh- und spätletalen Embryonen nach mutagener Behandlung der Spermien herangezogen. Am 3. Tag beginnt die Segmentierung, die am 4. Tag abgeschlossen ist. Darauf erfolgt, ebenfalls am 4. Tag, die Differenzierung des Kopfteils und die Streckung des Körpers zur schlupfreifen, spiralig gewundenen Larve.

4. Chromosomale Mutationstypen nach Bestrahlung

(Absolute Häufigkeitszahlen bei den einzelnen Dosen siehe Tab. 7)

a) Deletionen

Strukturheterozygote Tiere mit einem Chromosomenstückausfall im Bereich von 1 - 10 Banden wurden beobachtet. Größere Deletionen traten nicht auf.

b) Inversionen

Inversionen in jeder Größenordnung, von 3 Banden bis zur nahezu vollständigen Invertierung eines ganzen Chromosoms, können beobachtet werden. Parazentrische Inversionen sind der häufigste Mutationstyp.

c) Translokationen

Reziproke Translokationen mit einem oder beiden Bruchpunkten im Euchromatin traten sehr häufig auf. Reziproke Ganzarmverlagerungen waren nur selten. Translokationen, bei denen ein Bruchpunkt in der Endbande eines Chromosoms liegt, kamen häufig vor, in Anbetracht der relativ geringen DNS-Menge in einem Telomer.

d) Transpositionen und Kombinationen von Inversionen, Deletionen und Translokationen

Diese Aberrationstypen erfordern mindestens 3 unabhängige Brüche. Alle möglichen Kombinationspaare aus Inversionen, Translokationen und Deletionen wurden beobachtet. Kompliziertere Mutationstypen, zu deren Entstehung mehr als 3 Brüche notwendig sind, konnten in den überlebenden Larven nicht nachgewiesen werden. Häufig traten intrachromosomale Verlagerungen eines kleinen Segments (Shift) oder ein gegenseitiger Austausch zweier benachbarter Abschnitte (Tandeminversion) auf. Die interchromosomale Verlagerung eines Segments von einem Chromosom in ein anderes führt zu einer Transposition. Auffallend war auch hier, daß häufig kleine Segmente transponiert wurden.

e) Mosaik

Selten waren in den analysierten Tieren nur die Zellen einer Speicheldrüse von einer Chromosomenmutation betroffen, oder nur die vordere, bzw. die hintere Hälfte beider Speicheldrüsen (Anterior-Posterior Mosaik).

5. Häufigkeit der mutierten Spermien, bzw. Brüche pro Spermium, dominante Letalität und Anzahl der chromosomalen Aberrationen pro Spermium bei verschiedenen Röntgendosen

Nach Bestrahlung von Männchen des as-Stammes wurden insgesamt 779 Nachkommen in 3 Parallelserien mit 0,75; 1,5 und 2,25 KR untersucht. Es wurden 325 einfach oder mehrfach chromosomal mutierte Tiere mit insgesamt 424 Aberrationen gefunden.

Die Bestrahlung von Männchen des bs-Stammes mit 1,5 KR ergab 445 Nachkommen, darunter 139 mutierte Tiere mit 167 Aberrationen. Zahlenwerte bei den einzelnen Dosen können aus Tab. 7 entnommen werden.

Die Häufigkeit der mutierten Tiere in Abhängigkeit von der Dosis ist in Abb. 6 wiedergegeben. Der bs-Kontrollwert bei 1,5 KR fügt sich recht gut in die bereits untersuchte Dosiseffektbeziehung der mutierten Spermien (Tiere) ein. Der neu hinzugezogene as-Stamm erweist sich im Vergleich zu dem bs-Stamm als strahlensensitiver.

Aus Abb. 6 wird deutlich, daß hinsichtlich der chromosomalen Mutationsrate die Dosis 0,75 KR im as-Stamm ausreicht, um den gleichen Effekt zu induzieren, der im bs-Stamm erst bei 1 KR erreicht wird. Entsprechendes gilt für die Dosis 1,5 KR bei as und 2 KR bei bs, sowie 2,25 KR bei as und 3 KR bei bs. Die bs-Mutationskurve unterscheidet sich um den Dosiserhöhungsfaktor 1,33 von der entsprechenden as-Kurve. Der gleiche Unterschied tritt bei der Dosiseffektbeziehung der induzierten Brüche/Spermium auf (Abb. 6). Bis zur Dosis 0,75 KR im as-Stamm, bzw. 1 KR beim bs-Stamm laufen die Kurven für die mittlere Anzahl von Brüchen pro Spermium mit der chromosomalen Mutationskurve des entsprechenden Stammes

nahezu parallel. Das entspricht dem Befund, daß bei der niedrigsten Dosis in beiden Stämmen fast ausschließlich einfach mutierte Spermien auftreten (siehe Tab. 7). Der stärkere Anstieg bei den höheren Dosen kommt durch mehrfach mutierte Spermien zustande, wobei die 2-Bruchaberrationen den Hauptschadenstyp stellen (Abb. 7).

Der durch den Dosiserhöhungsfaktor 1,33 charakterisierte Sensitivitätsunterschied zwischen beiden Stämmen findet sich auch bei der Eisterberate. In Abb. 8 a sind die Eisterberaten (Tab. 9) und chromosomalen Mutationsraten beider Stämme vergleichend dargestellt. Dabei wird deutlich, daß zwischen bs und as sowohl in der chromosomalen Mutationsrate als auch in der Eisterberate die gleiche Differenz besteht. Der kausale Zusammenhang zwischen Chromosomenmutationen und dominanten Letalfaktoren wird bei Darstellung der Kurven aus Abb. 8 a im Wahrscheinlichkeitsnetz noch deutlicher (Abb. 8 b). In Abhängigkeit vom Logarithmus der Dosis ergeben sich Geraden, die parallel verlaufen. Die Probitanalyse und Kovarianzanalyse bestätigen die Linearität und Parallelität. Im folgenden sind die Probitgeraden mit den entsprechenden χ^2 -Werten für die Streuung um die Regression angegeben:

Chromosomenmutationen bs:

$$Y = 4,0 + 3,3 x \quad \chi^2_2 = 1,06 \quad P \quad 0,05$$

Chromosomenmutationen as:

$$Y = 4,4 + 3,1 x \quad \chi^2_1 = 0,71 \quad P \quad 0,05$$

Dominant Letale bs:

$$Y = 4,8 + 3,0 x \quad \chi^2_1 = 4,08 \quad P \quad 0,05$$

Dominant Letale as:

$$Y = 5,1 + 3,6 x \quad \chi^2_1 = 0,06 \quad P \quad 0,05$$

Abbildung 6

Häufigkeit der chromosomal mutierten Tiere (Sperm mutated) in Abhängigkeit von der Dosis (durchgezogene Kurven nach Bestrahlung von Männchen des as- und bs-Stammes im Vergleich zur Anzahl der Chromosomenbrüche pro Tier (Breaks/Sperm) in Abhängigkeit von der Dosis (gestrichelte Kurven)

Abbildung 7

Prozentualer Anteil der 2- und 3-Bruch-Aberrationen nach Bestrahlung des as- oder bs-Stammes. Werte für bs aus: Israelewski (1975).

Gegenübergestellt wurden Bestrahlungsdosen, die in beiden Stämmen die gleiche Eisterblichkeit induzieren. Die Unterschiede zwischen beiden Stämmen sind nicht signifikant (χ^2 , $P = 0,05$).

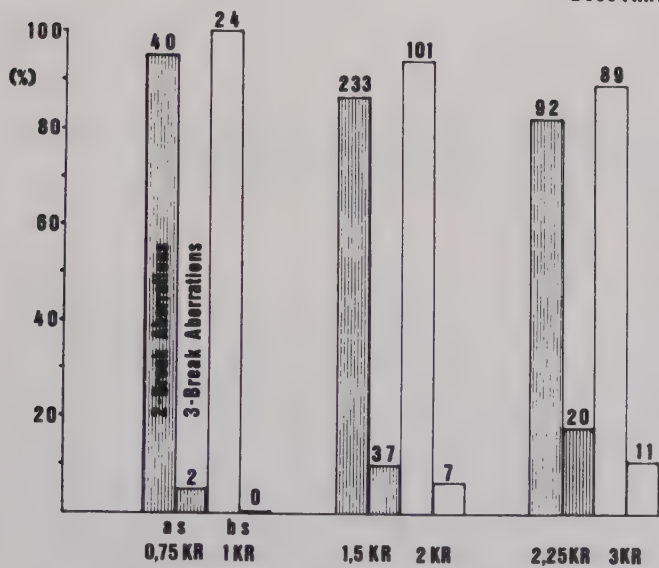
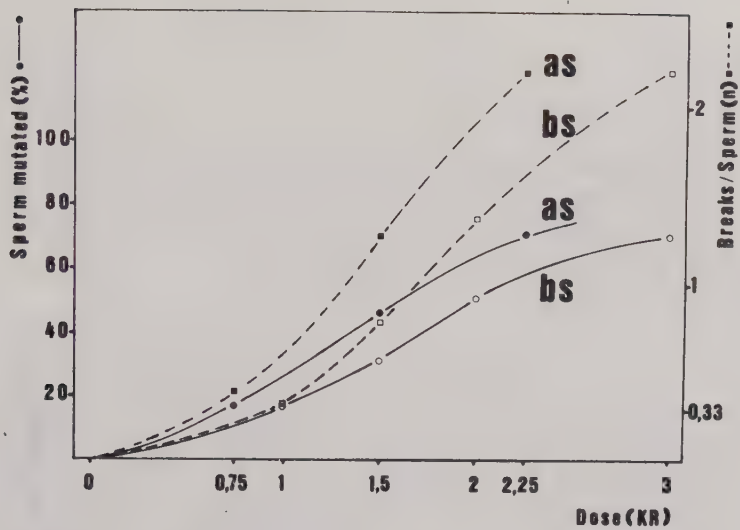


Abbildung 8

a) Vergleich der embryonalen Sterberate (Egg mortality) mit der chromosomalen Mutationsrate (Sperm mutated) in Abhängigkeit von der Dosis nach Bestrahlung des as- und bs-Stammes von Phryne cincta.

b) Die gleichen Kurven im Wahrscheinlichkeitsnetz in Abhängigkeit vom Logarithmus der Dosis.

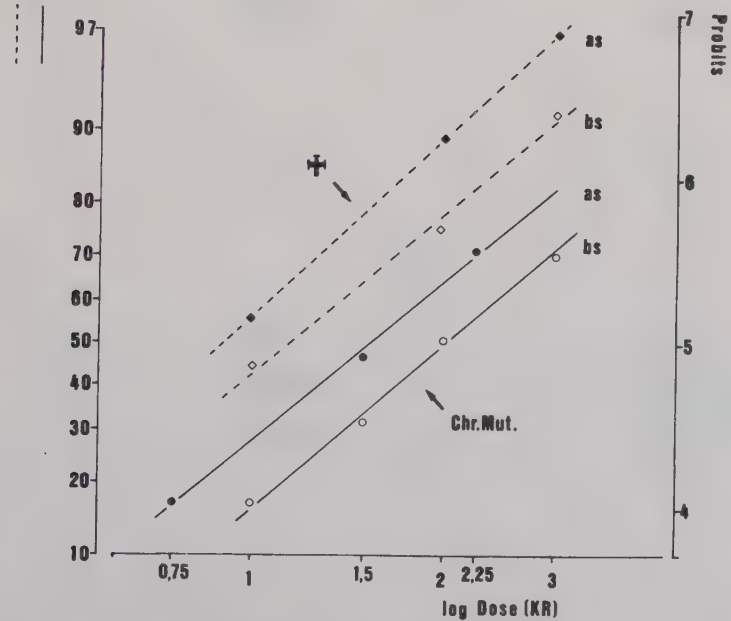
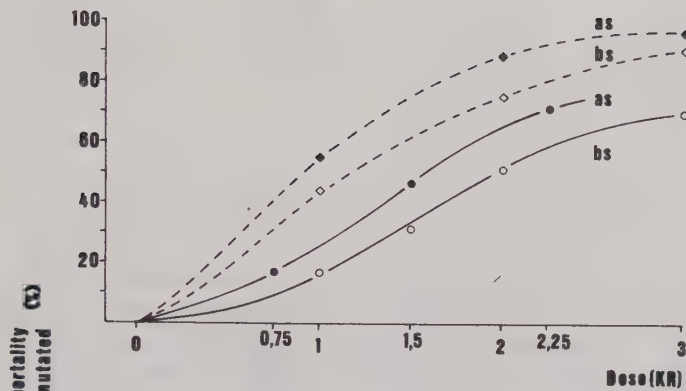
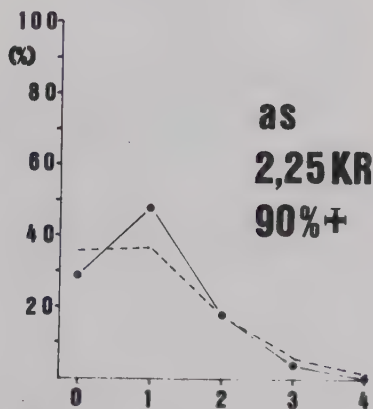
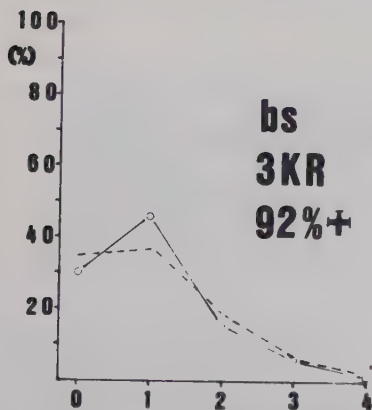
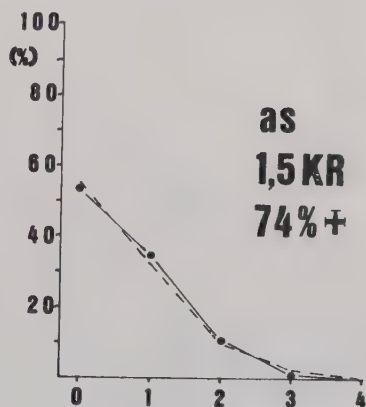
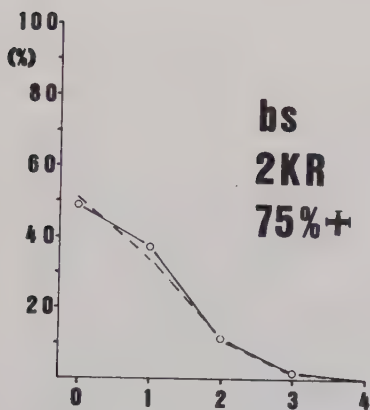
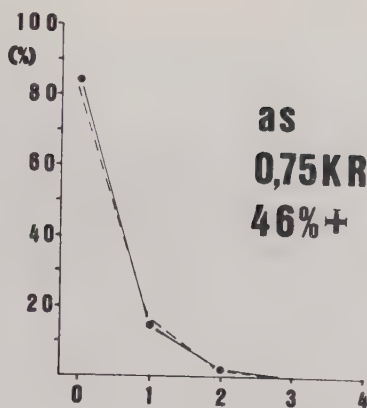
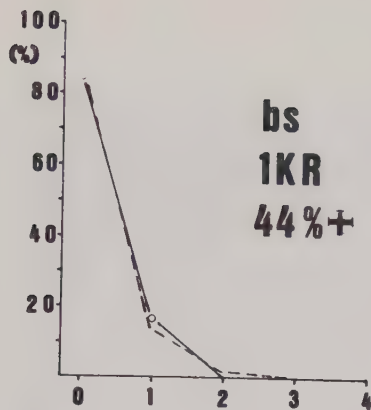


Abbildung 9

Prozentuale Häufigkeitsverteilung chromosomaler Mutationen pro Spermium nach Bestrahlung des bs- und as-Stammes. Gegenübergestellt wurden jeweils die Häufigkeitsverteilungen von bs und as, die sich bei etwa gleicher Eisterblichkeitsrate in beiden Stämmen ergeben. Die Häufigkeitsverteilungen des bs- und as-Stammes wurden jeweils mit der entsprechenden Poisson-Verteilung verglichen (gestrichelte Linie).

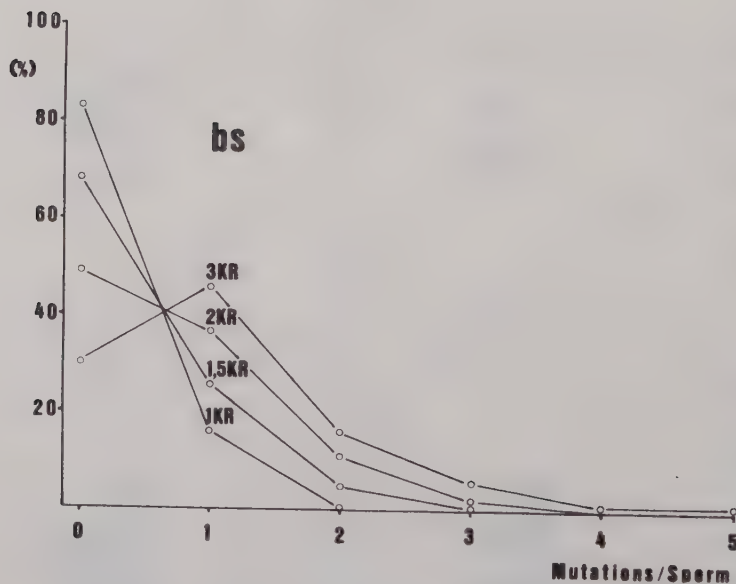


Mutations/Sperm(n)

Abbildung 10

Gegenüberstellung der prozentualen Häufigkeitsverteilung chromosomaler Mutationen pro Spermium nach Bestrahlung des bs-Stammes mit 1, 1,5, 2 und 3 KR.

Werte für 1, 2 und 3 KR aus: Israelewski (1974).



Die Parallelität ist mit einem F-Wert von 1,7 bei 3/5 Freiheitsgraden gut gesichert.

Die Beziehung der chromosomalen Mutationsrate zur dominanten Letalität läßt sich schließlich bis zur Verteilung der induzierten Mutationen in den Spermien verfolgen. Aus Abb. 9 geht deutlich hervor, daß eine bestimmte Letalitätsrate, unabhängig vom verwendeten Stamm, mit einem charakteristischen Verteilungsbild der chromosomalen Aberrationen in den Spermien verbunden ist (absolute Werte zur dominanten Letalität, siehe Tab. 8 und 9, zur Verteilung, siehe Tab. 10 und 11). Die aus dem Mittelwert jeder Verteilung berechneten Poissonverteilungen stimmen mit den experimentellen Kurven bis zur mittleren Dosis in jedem Stamm sehr gut bis gut überein. Bei 75 % Sterblichkeit zeichnet sich aber schon bei der O-Klasse ein zu hoher theoretischer Wert, bei der 1-Klasse dagegen ein zu niedriger Wert ab, das im verstärkten Maß bei den hohen Dosen zu einer unbefriedigenden Übereinstimmung der experimentellen Gesamtverteilung mit der theoretischen führt.

Die Projektion der einzelnen Verteilungen bei den verschiedenen Dosen in ein Koordinatensystem gibt Abb. 10 wieder. Alle Verteilungen haben bei ca. 0,6 Aberrationen pro Spermium eine gemeinsame Häufigkeit von etwa 40 %.

6. Überlebensrate nach Bestrahlung in Abhängigkeit vom Genotyp des Weibchens und nach Vorbehandlung der Spermien mit Sauerstoff oder Stickstoff

Nach Bestrahlung von as-Männchen ist es gleichgültig, ob mit einem as- oder bs-Weibchen gekreuzt wird. In beiden Fällen ergibt sich die gleiche Letalitäts-, bzw.

Abbildung 11

Die Wirkung von Röntgenstrahlen auf reife Spermien des as- und bs-Stammes von Phryne cincta auf die Rate überlebender Embryonen (Egg survival).

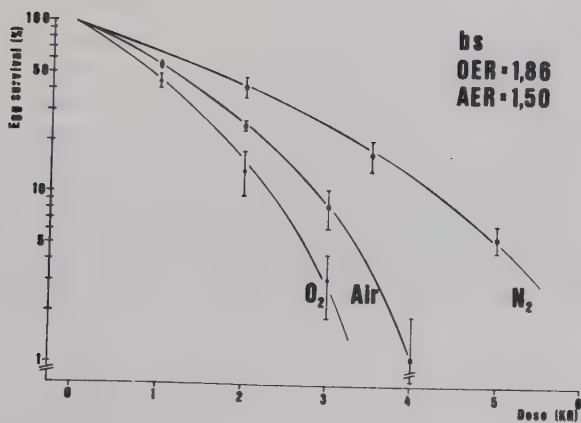
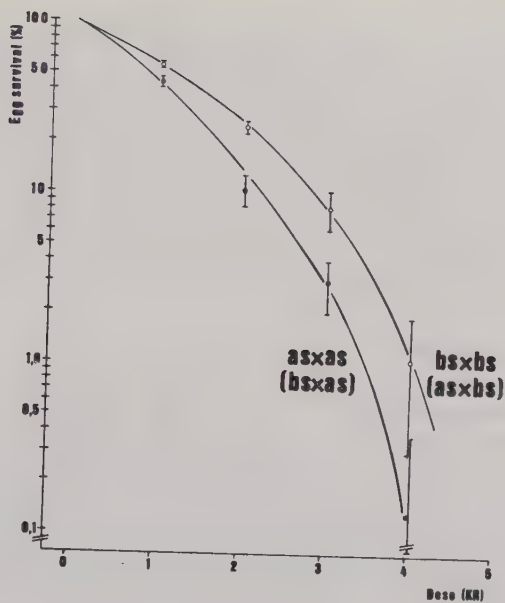
a) as x as

bs x as : Die Dosiseffektkurven für Überlebende aus der Kreuzung:
as-Weibchen x bestrahltes as-Männchen
und für
bs-Weibchen x bestrahltes as-Männchen
verlaufen innerhalb der eingetragenen Fehlerbreiten ($P = 0,05$).

bs x bs

as x bs : Die Fehlerbreiten ($P = 0,05$) der embryonalen Überlebensraten überschneiden sich bei jeder Dosis:
bs-Weibchen x bestrahltes bs-Männchen
as-Weibchen x bestrahltes bs-Männchen

b) Überlebende Embryonen (%) nach 40 Min. Vorbehandlung mit O_2 , Luft oder N_2 und anschließender Bestrahlung von bs-Männchen in der entsprechenden Atmosphäre.
OER: Sauerstofferhöhungsrate
AER: Lufterhöhungsrate
gemessen bei 10, 20 und 30 % Überlebenden.



Überlebensrate in den Nachkommen. Entsprechendes gilt für die Kreuzung bestrahlter bs-Männchen. Der Sensitivitätsunterschied zwischen beiden Stämmen wird somit allein vom Genotyp des Männchens bestimmt (Abb. 11 a; absolute Werte in Tab. 9). Dabei ist zu berücksichtigen, daß der Unterschied im Genotyp der as- und bs-Tiere lediglich auf dem strukturell unterschiedlichen X-Chromosom beruht. Eine Unterscheidung zwischen X- und Y-tragenden Spermien ist in diesem Versuch nicht möglich.

Eine Vorbehandlung der Spermien mit Stickstoff führt zu einer Erniedrigung der Letalitätsrate, bzw. zur Erhöhung der Überlebensrate um den Faktor 1,5 gegenüber der Bestrahlung in Luft. Die Sauerstoffvorbehandlung bedingt im Vergleich zur N₂-Behandlung eine Sensitivitätssteigerung um den Faktor 1,86 (Abb. 11 b; Zahlenangaben in Tab. 9). Zur Darstellung des Sauerstoff-Stickstoffeffekts bei Phryne cincta wurde nur der bs-Stamm herangezogen.

7. Häufigkeit und Verteilung strahleninduzierter Brüche

907 Bruchorte von insgesamt 424 im as-Stamm induzierten Aberrationen wurden mit Hilfe der Chromosomenkarte lokalisiert. Im bs-Stamm wurden zu den in dieser Untersuchung erhaltenen 167 Aberrationen noch weitere 249 Chromosomenmutationen aus früheren Bestrahlungsreihen untersucht, so daß insgesamt 868 Brüche in die Karte eingetragen werden konnten (Abb. 12; Zahlenwerte Tab. 12). Die Bruchverteilung in den Autosomen läßt keinen auffallenden Unterschied zwischen beiden Stämmen erkennen. Es wurde deshalb zusätzlich die Summe beider Verteilungen dargestellt.

Es zeichnet sich eine größere Bruchneigung DNS-reicher Banden gegenüber dünnen Banden ab. Die vier prominenten, kinetochornahen Banden in Chromosom 2 (a) werden relativ häufiger von Brüchen betroffen als danebenliegende dünne Banden. Die heterochromatischen Kinetochorbereiche, sowie die beiden heterochromatischen Blöcke im X_a -Chromosom zeichnen sich durch besonders hohe Bruchfrequenzen aus. Berücksichtigt man jedoch die Länge, die diese heterochromatischen Bereiche in den Mitosechromosomen einnehmen (siehe Punkt 1), dann reduziert sich die scheinbar hohe Bruchfrequenz. In den Autosomen 2 und 3 sollten etwa 5 % aller Brüche pro Chromosom in den Kinetochorbereichen auftreten; beobachtet wurden 7,12 % bei as und 3,1 % bei bs in Chromosom 3. Entsprechend der relativen Länge des Kinetochorbereichs von Chromosom 4, sind in diesem Abschnitt 10 % der Brüche zu erwarten. Beobachtet wurden 11,1 % bei as und 12,3 % bei bs.

Die genaue Lokalisation von Bruchorten im X-Chromosom wird hier durch die allgemein diffuse Bandenstruktur erschwert und wurde deshalb auch bei den folgenden Betrachtungen nicht berücksichtigt.

In den Autosomen entspricht die relative Bruchhäufigkeit pro Chromosom sehr genau dem relativen Längenteil des betreffenden Chromosoms im Genom. Im Chromosom 2 wurden bei as 379 Brüche gefunden, zu erwarten waren 372,6. Bei bs konnten im gleichen Chromosom 357 Bruchorte ermittelt werden, erwartet wurden 356,2. Weitere Werte können der Tab. 12 entnommen werden.

Die Verteilung der Brüche in jedem Abschnitt der Chromosomenkarte ist dagegen nicht zufällig, sondern zeigt erhebliche Schwankungen.

Abbildung 12

Anzahl und Verteilung strahleninduzierter Brüche im as-Stamm (unteres Chromosom) und im bs-Stamm (mittleres Chromosom). Zusammengefaßte Werte aus beiden Stämmen (oberes Chromosom).

a) Chromosom 2, a-Arm

as : 188 Brüche

bs : 176 Brüche

b) Chromosom 2, b-Arm

as : 191 Brüche

bs : 181 Brüche

c) Chromosom 3, a-Arm

as : 127 Brüche

bs : 111 Brüche

d) Chromosom 3, b-Arm

as : 138 Brüche

bs : 127 Brüche

e) Chromosom 4

as : 217 Brüche

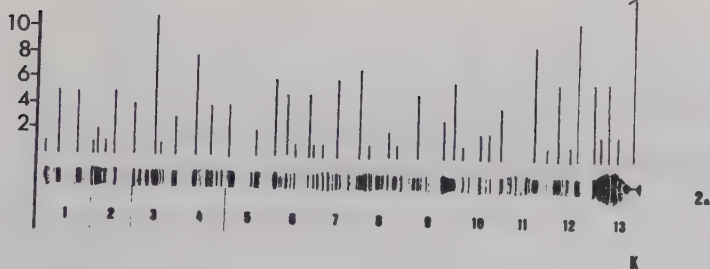
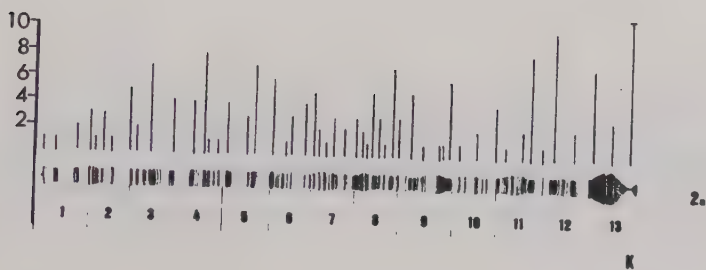
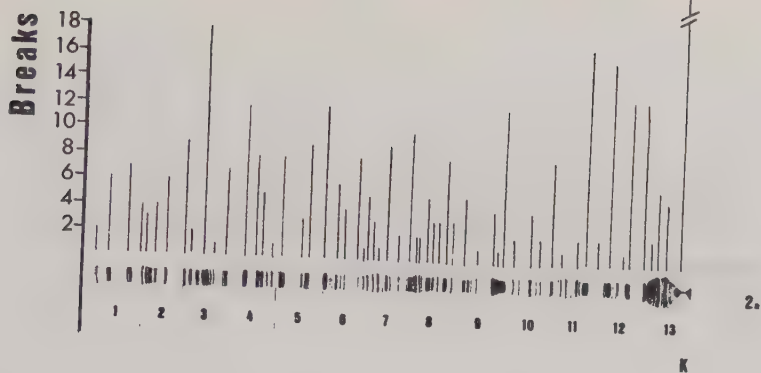
bs : 228 Brüche

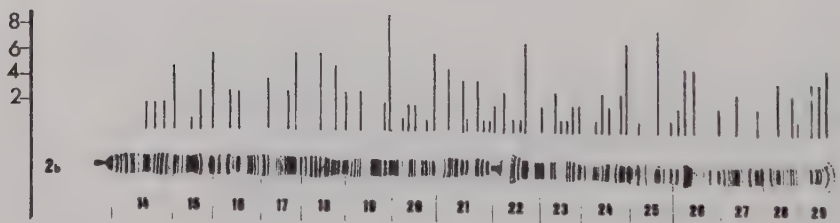
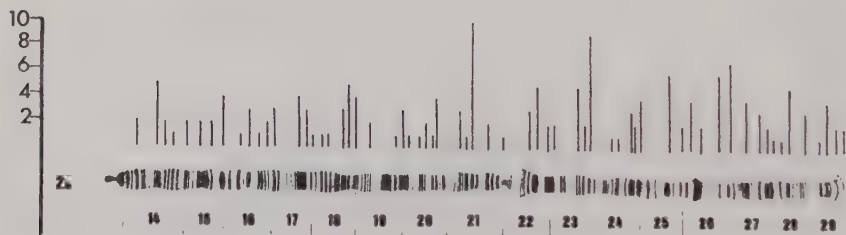
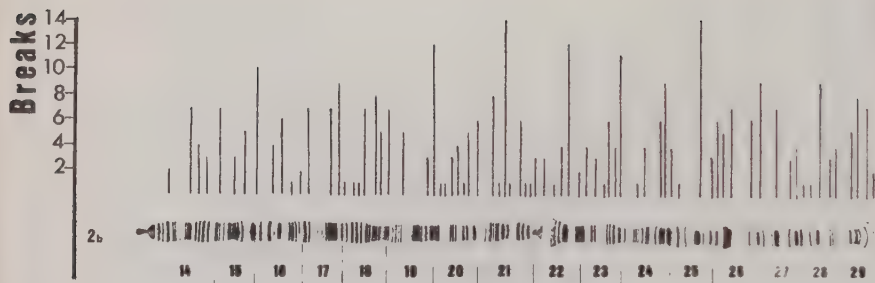
f) Chromosom X_a und X_b

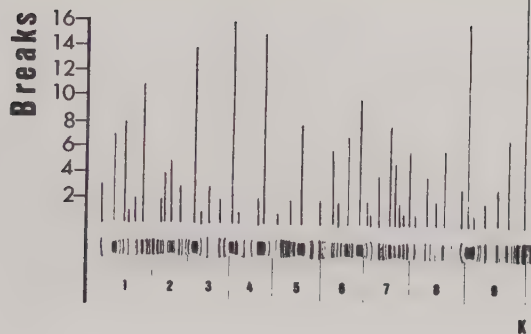
X_a : 46 Brüche

X_b : 45 Brüche

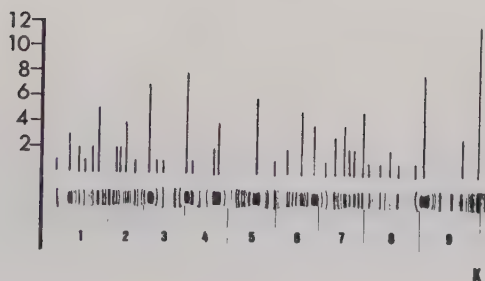
Gesamtsumme as + bs: 1775 Brüche



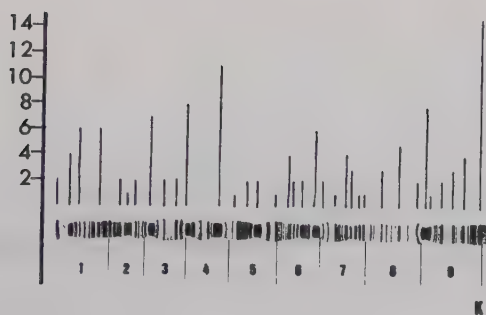




3.

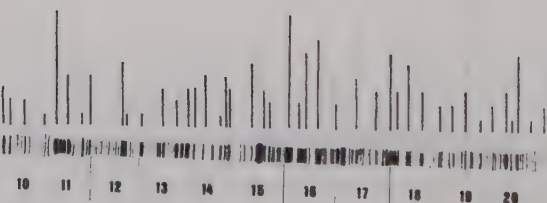
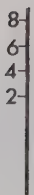
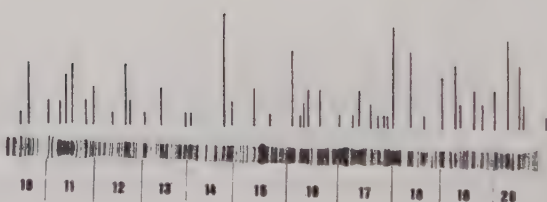
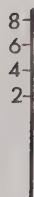
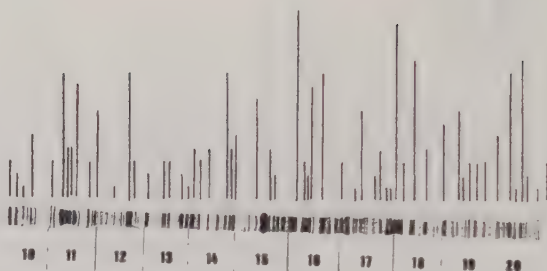
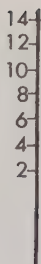


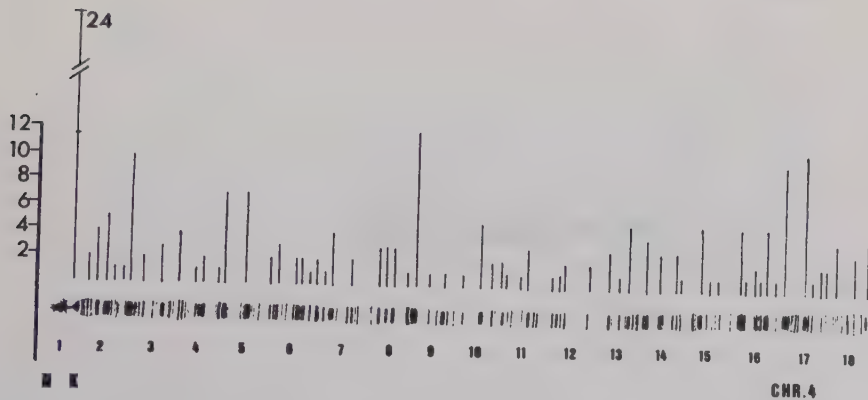
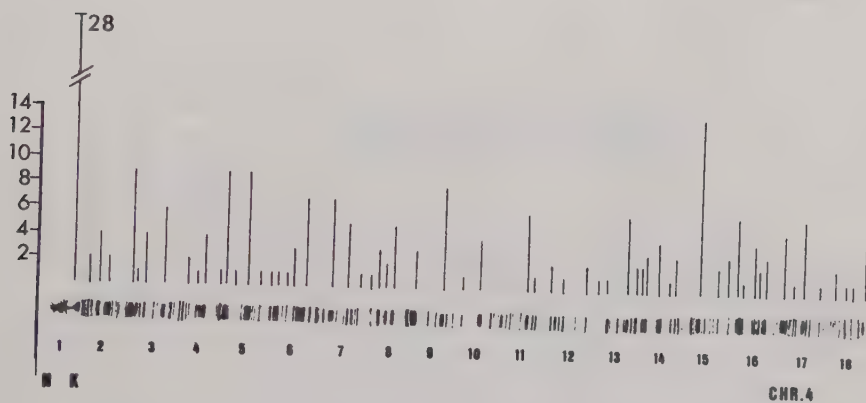
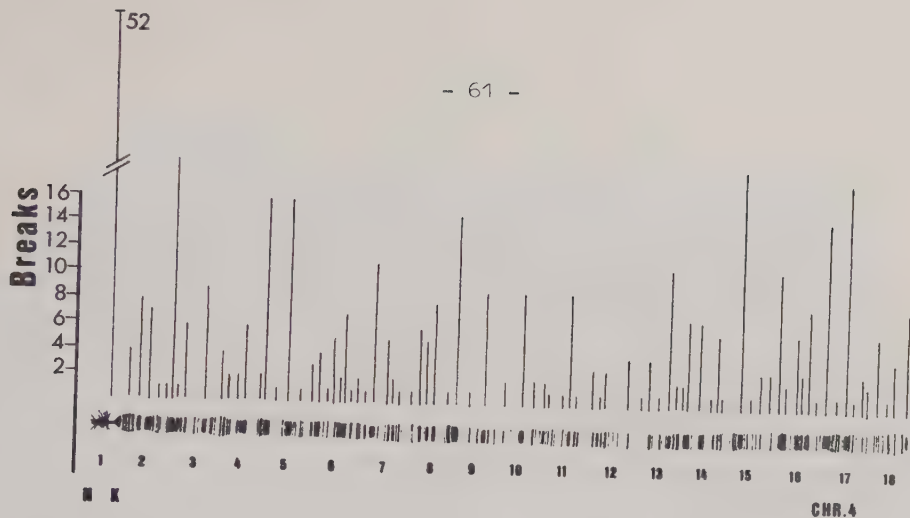
3.



3.

Breaks





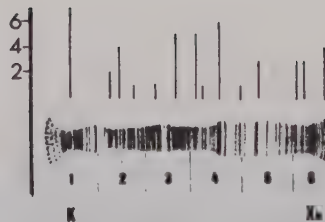
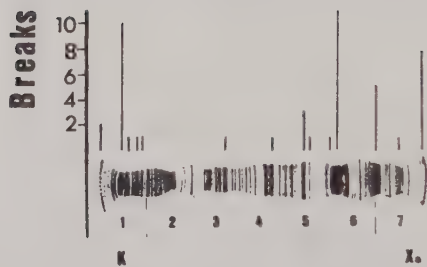


Abbildung 13

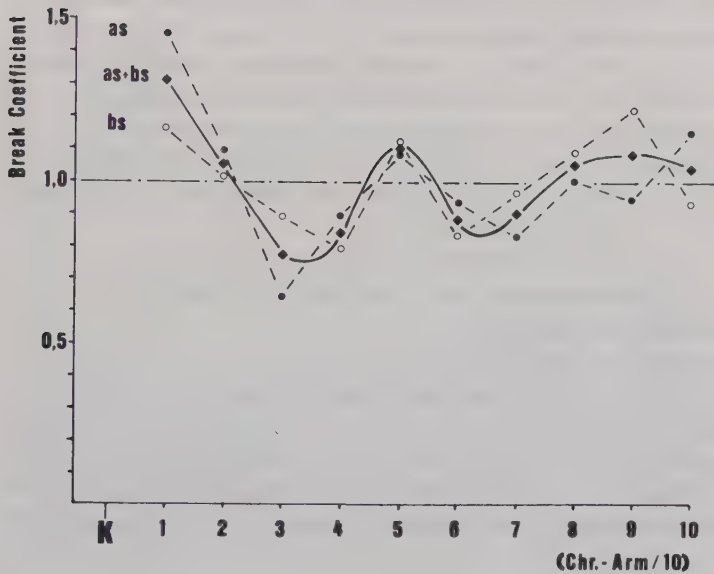
Mittlerer Bruchkoeffizient in 10 gleichen Teilen jedes Chromosomenarms (Chr.-Arm/10). Der Bruchkoeffizient 1 entspricht der Erwartung bei zufälliger Bruchverteilung.

K : Kinetochor

Gesamtzahl der Bruchereignisse

in as, N = 861

in bs, N = 823



Ob diesen Änderungen von Abschnitt zu Abschnitt irgendwelche Gesetzmäßigkeiten zugrunde liegen, die bei der Betrachtung jedes einzelnen Chromosomenarms nicht deutlich werden, sollte durch die Aufteilung jedes Chromosomenarms in 10 gleiche Abschnitte geprüft werden. Dazu wurde für jeden Chromosomenarm und für jeden 1/10 Abschnitt der Bruchkoeffizient aus der beobachteten Bruchanzahl dividiert durch die erwartete Bruchanzahl (bei zufälliger Verteilung der Brüche in jedem 1/10 Abschnitt) bestimmt. Der Mittelwert aus den so erhaltenen Bruchkoeffizienten jedes 1/10 Abschnitts ist in Abb. 13 eingetragen. Es ergibt sich in beiden Stämmen eine gleichsinnige und systematische Schwankung der Bruchhäufigkeit über den Chromosomenarmen. Die zusammengefaßten Werte beider Stämme erinnern in ihrer Verteilung an eine abklingende Sinusschwingung (Abb. 13). Die hohe Beteiligung des Abschnitts 1 am Gesamtbruchgeschehen geht hauptsächlich auf Brüche in den Kinetochorbereichen zurück, und würde, bezogen auf die Mitosechromosomen, auf 1 absinken. Somit können nur der mediane und distale Bereich in der Gesamtverteilung als "echte" Maxima angesehen werden.

8. Aberrationskinetik und Häufigkeit verschiedener Aberrationstypen

Die Erweiterung des bereits früher bei bs erhobenen Materials hat die danach gefundene Beziehung der Häufigkeiten von Inversionen und Translokationen zur Dosis bestätigt. Inversionen stellen bei jeder Dosis den Hauptaberrationstyp und sind etwa zweimal häufiger als Translokationen. Die Häufigkeitskurve für die Summe aller

Aberrationstypen erreicht bei der höchsten Dosis von 3 KR den Wert von 1. Der gleiche Effekt wird bei as bereits bei der Dosis von 2,25 KR erzielt. Entsprechendes gilt für die Dosis 2 KR bei bs und 1,5 KR bei as sowie 1 KR bei bs und 0,75 KR bei as. Es ergibt sich demnach wiederum ein Sensitivitätsunterschied in der Beziehung der chromosomalen Aberrationen pro Spermium zur Dosis um den Faktor 1,33 (Abb. 14; siehe auch Tab. 7). Das gilt nur für die Summenbeziehungen zur Dosis. Die bei bs sichtbare Differenz in der Häufigkeit von Inversionen und Translokationen gleicht sich im as-Stamm weitgehend aus.

Das erfolgt in gleichem Maß zugunsten der Translokation und zuungunsten der Inversionen (siehe Abb. 15), so daß die Summenbeziehung davon unbeeinflußt bleibt.

Jede einzelne, in Abb. 14 dargestellte Beziehung der Aberrationen pro Spermium zur Dosis, ist im Bereich 0 - 2 KR bei bs und 0 - 1,5 KR bei as mit der Funktion $Y = k \cdot D^2$ innerhalb der eingezeichneten Fehlergrenzen identisch. Bei der höchsten Dosis macht sich ein Sättigungseffekt bemerkbar. Die dadurch bedingte Änderung im Kurvenverlauf wird nach der Funktion erwartet, die Wolff (1963) für die Häufigkeit chromosomaler Aberrationen in Abhängigkeit von der Dosis entwickelte. Er geht davon aus, daß die Wahrscheinlichkeit, ein Chromosom durch Röntgenstrahlen zu brechen, durch die Eintrefferkomponente $e^{-k \cdot D}$ gegeben ist. Die Wahrscheinlichkeit, einen bestimmten Ort zu treffen, ist dann $1 - e^{-k \cdot D}$, und für 2 Brüche in einem Kontaktbereich $(1 - e^{-k \cdot D})^2$. Die beobachtete Häufigkeit der Aberrationen pro Spermium (y) ist weiterhin direkt proportional zur mittleren Anzahl

Abbildung 14

Häufigkeiten von Inversionen, Translokationen und der
Summe aller Aberrationstypen pro Individuum
(Aberrations/Sperm) in Abhängigkeit von der Dosis.

Die Summenkurven wurden mit der Funktion

$y = n \cdot (1 - e^{k \cdot D})^2$ verglichen (gestrichelt).

n : effektive Anzahl von Sites

k : Trefferkonstante

D : Dosis (R)

$$n_{bs} = 3,1$$

$$k_{bs} = 0,00029$$

$$P = 0,5$$

$$n_{as} = 3,4$$

$$k_{as} = 0,00036$$

$$P = 0,9$$

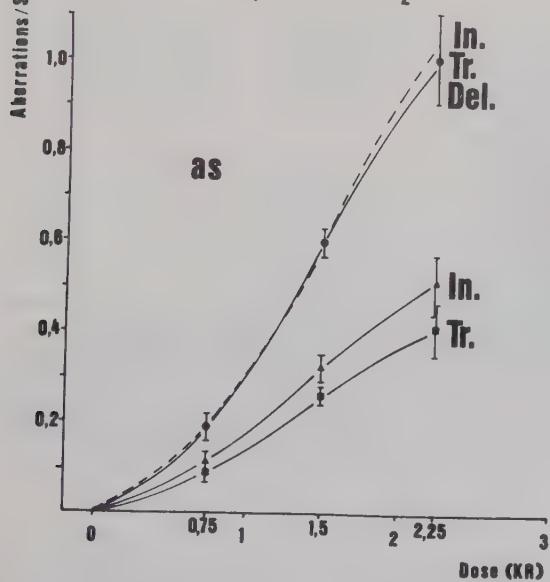
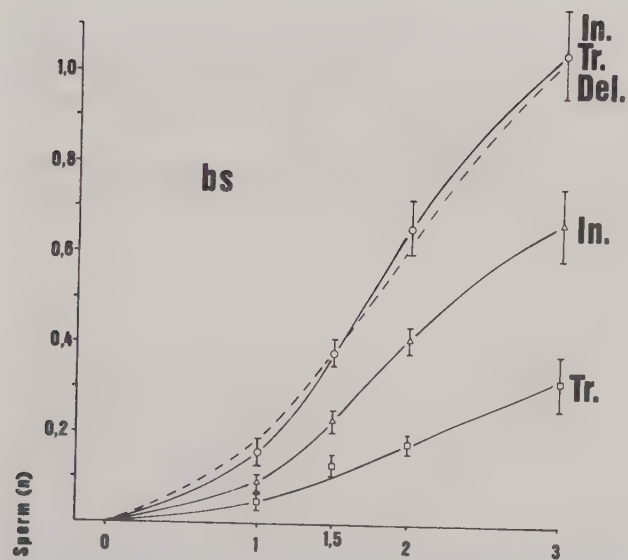
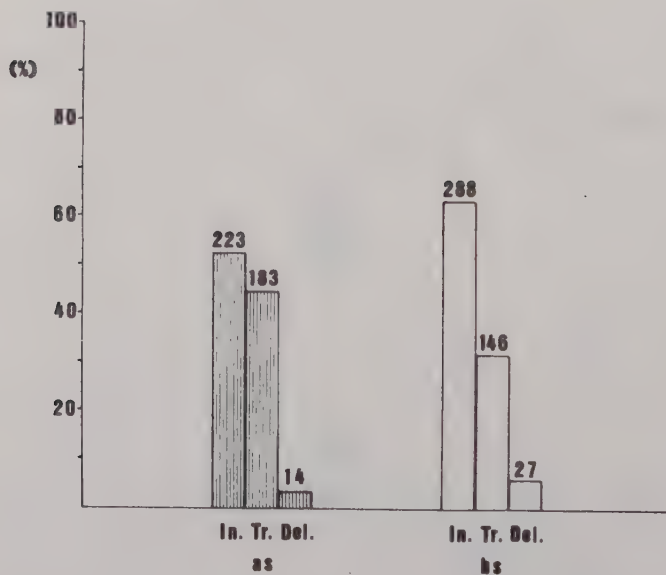


Abbildung 15

Relative Häufigkeiten der Mutationstypen (Inversionen, Translokationen und Deletionen) nach Bestrahlung des bs- und as-Stammes von Phryne cincta.

Zusammengefaßte Werte aus 4 Bestrahlungsdosen bei bs und 3 Dosen bei as.



von Kontaktbereichen (Sites) im Kern, die für sichtbare Aberrationen zur Verfügung stehen (effektive Site - Zahl, n) : $y = n \cdot (1 - e^{-k \cdot D})^2$.

Die Parameter n und k für die Beziehung der Summe aller Aberrationstypen zur Dosis bei bs und as wurden graphisch ermittelt, indem die Funktion von n für jede Dosis dargestellt wurde, wobei y jeweils durch die ermittelte Aberrationshäufigkeiten pro Spermium gegeben ist. Der Bereich, in dem sich die einzelnen Kurven bis auf einen minimalen Abstand nähern, kennzeichnet dann Wertepaare für n und k . Die daraus resultierenden theoretischen Beziehungen der Aberrationshäufigkeit zur Dosis sind in Abb. 14 gestrichelt eingezeichnet. Es ergibt sich, nach Prüfung mit dem χ^2 -Verfahren, eine gute bis sehr gute Übereinstimmung der experimentellen mit den theoretischen Werten.

9. Kinetochor-Bruch Abstandsdifferenzen von reziproken Translokationen, Bruchabstände von Inversionen und Windungsumfang der Spiralen in Speicheldrüsenchromosomen

Die unter 2. beschriebene Polfeldorientierung der Chromosomen in bs -Spermien ist auch im Pronukleusstadium zum Zeitpunkt der Aberrationsentstehung nachweisbar. Die Tendenz zum Fortbestehen der interchromosomalen Lagebeziehungen in den Spermien bis zum Pronukleusstadium äußert sich häufiger als bei zufälliger Lage der Chromosomen erwartet, in ähnlichen Abständen der Translokationsbruchpunkte zum jeweiligen Kinetochor in beiden beteiligten Chromosomen. Die Differenz der Kinetochor-Bruch Abstände bietet eine Berechnungsgrund-

lage für die Bestimmung der Lagebeziehungen der Chromosomen im Pronukleus (Abb. 16). Gegenüber der bei zufälliger Lage der Chromosomen im Pronukleus erwarteten Poissonverteilung ergibt sich neben dem Maximum bei der Differenzklasse 2 - 3 ein sekundäres Maximum bei der Differenzklasse 8 (Differenzklasse 1 = 1 Kartenabschnitt). Da auch nach Bestrahlung von as-Spermien bei Klasse 8 ein deutlich erhöhter Wert im Gesamtverlauf der Kurve erkennbar ist, muß für das Zustandekommen des sekundären Maximums bei bs außer der Polfeldanordnung noch ein anderes Ordnungsprinzip der Chromosomen im Kern vorliegen. Beim as-Stamm erscheint es zudem fraglich, ob der weitgehend ausgeglichene Verlauf der Kurve bis zur Abstandsklasse 5 noch mit der Annahme einer Polfeldorientierung der Chromosomen vereinbar ist. Der unterschiedliche Verlauf der as- und bs-Kurve bei niedrigen Abstandsdifferenzen sollte allein auf die X-tragenden Spermien zurückzuführen sein, da sowohl die Autosomen als auch das Y-Chromosom in beiden Stämmen identisch sind. Diese Annahme bestätigt sich bei einer getrennten Darstellung der reziproken Translokationen aus männlichen und weiblichen Larven. Der Kurvenverlauf der Abstandsdifferenzen von Translokationen aus Y-tragenden Spermien ist in beiden Stämmen identisch. Die etwas größere Streuung der Einzelwerte um die Ausgleichskurve bei as geht vermutlich allein auf die mit der Aufgliederung des Gesamtmaterials verbundene Erniedrigung der absoluten Anzahlen reziproker Translokationen zurück. Mit der Aufgliederung wird jedoch deutlich, daß das längere X-Chromosom im as-Stamm eine gegenüber dem bs-Stamm unterschiedliche Anordnung der Autosomen im Pronukleus

hervorrufen (siehe auch Tab. 13).

Ein weiterer Unterschied zwischen beiden Stämmen ist aus der Verteilung der Inversionslängen ersichtlich (Abb. 17; Tab. 14). Beim as-Stamm erfolgt der Abfall der häufig beobachteten kleinen Inversionen zu den selteneren, größeren Inversionen zu niedrigeren Werten verschoben.

Zur Abstandsklasse 0 wurden alle Inversionen gezählt, deren Bruchabstand kleiner war als eine halbe Abschnittslänge in der Chromosomenkarte. Die Klasse 0 kann deshalb nicht mit den anderen Abstandsklassen (≥ 1) verglichen werden, die eine ganze Abschnittslänge umfassen.

Der experimentell erhaltene Kurvenverlauf bei as und bs läßt sich ausreichend gut mit jeweils 2 Poissonverteilungen beschreiben, die für kleine und große Inversionen getrennt berechnet wurden. Die unterschiedliche Lage der Grenze zwischen kleinen und großen Inversionen bei beiden Stämmen ergibt sich aus der bestmöglichen Anpassung der Poissonverteilung für kleine Inversionen. In beiden Stämmen umschwingt die experimentell erhaltene Kurve die theoretische in auffallend gleichförmiger und gleichsinniger Weise.

Die so erhaltenen, mittleren Bruchabstände von kleinen Inversionen betragen bei as 1,7 und bei bs 2,1 Längeneinheiten und stimmen erstaunlich genau mit dem mittleren Windungsumfang von lichtmikroskopisch sichtbaren Spiralen in den Riesenchromosomen überein (bei as: 1,8 und bei bs: 2,2).

Der stammspezifische, unterschiedliche Windungsumfang in den Riesenchromosomen wird allein vom jeweili-

Abbildung 16

Prozentuale Verteilung reziproker, autosomaler Translokationen mit verschiedenen Kinetochor-Bruch Abstandsdifferenzen (Kinetochor-Break Difference) nach Bestrahlung von Spermien des bs- und as-Stammes von Phryne cincta.

Für bs und as wurden jeweils die Poissonverteilungen mit entsprechendem Mittelwert eingezeichnet (gestrichelt; obere Verteilung bs, mittlere Verteilung as), in der unteren Verteilung wurde die Poissonverteilung nur für Translokationen in männlichen Nachkommen berechnet.

Anzahl der ausgewerteten Translokationen

bei bs,	N = 111
bei as-Weibchen,	N = 80
bei as-Männchen,	N = 53

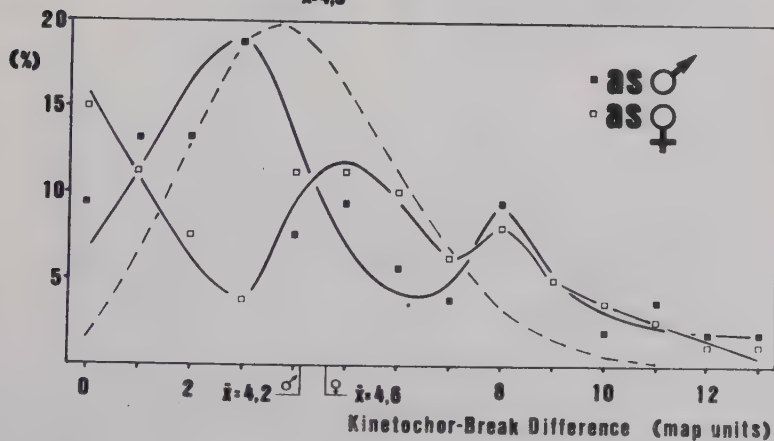
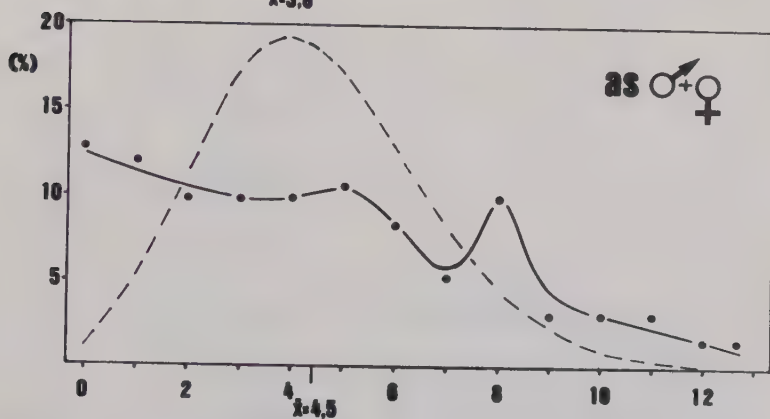
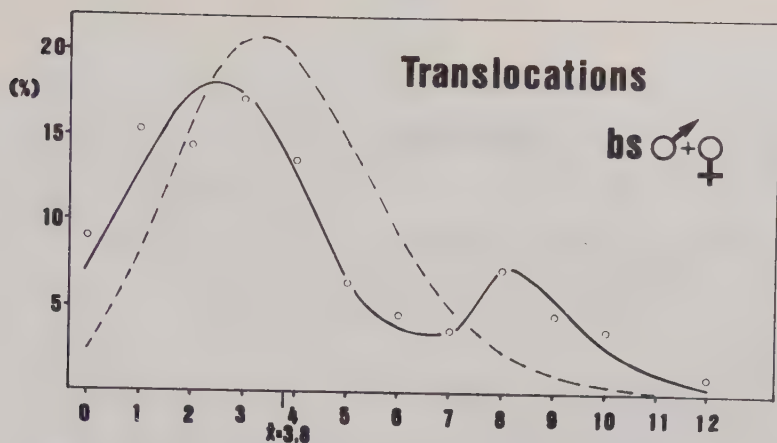


Abbildung 17

Prozentuale Verteilung der Längen (Length, map units) von Inversionen nach Bestrahlung von Spermien des bs- und as-Stammes von Phryne cincta.

Die Klasse 0 (siehe Text) wurde in der Abbildung nicht berücksichtigt. Längenklassen über 13 Einheiten, siehe Tabelle 14).

Für kleine Inversionen, die den ersten Peak bilden (Field 1) und für große Inversionen (Field 2) wurden getrennt Poissonverteilungen berechnet (gestrichelt; mittlere Verteilung bs, untere Verteilung as). Die Grenze zwischen großen und kleinen Inversionen ergibt sich aus der Anpassung der Poissonverteilung für kleine Inversionen.

$\bar{X}$ bei bs : 2,1

$\bar{X}$ bei as : 1,7

Gesamtanzahl der ausgewerteten Inversionen

bei bs, N = 272

bei as, N = 180

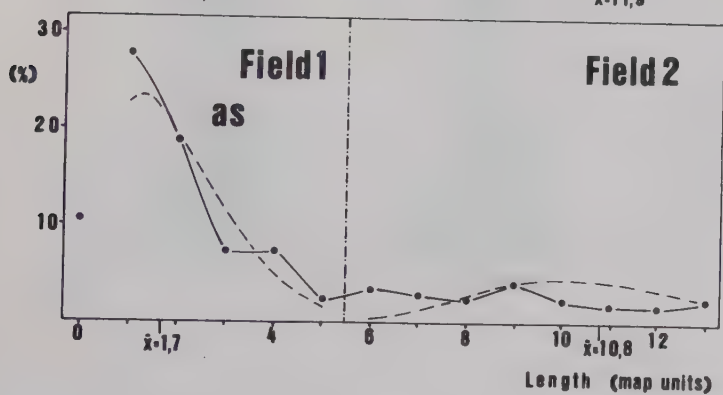
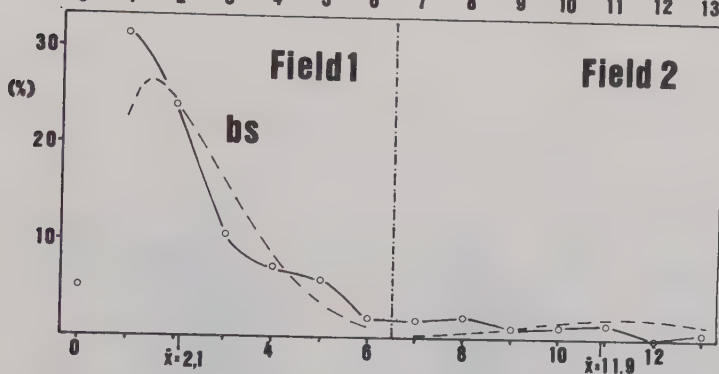
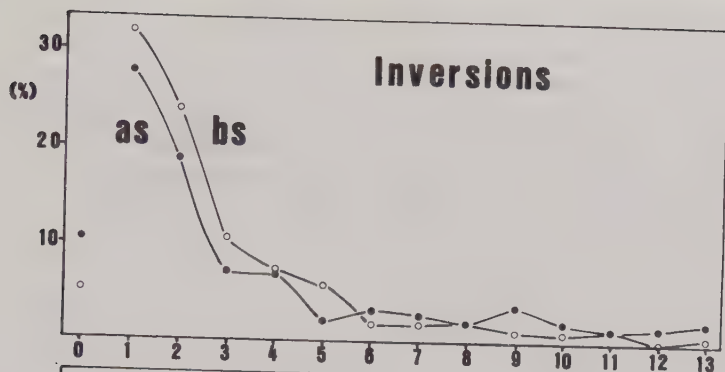


Abbildung 18

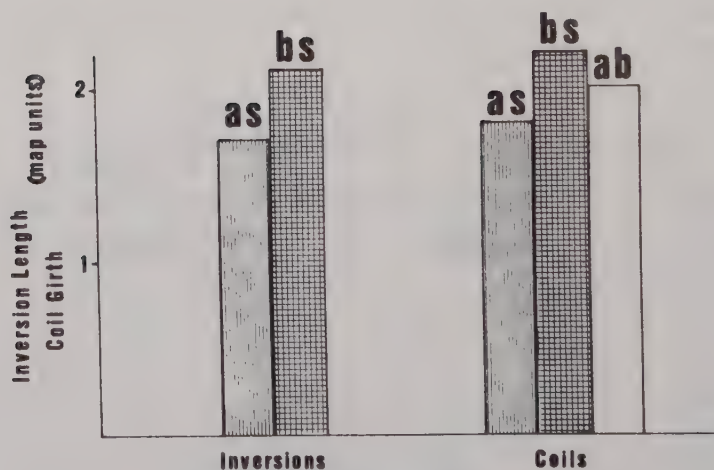
Vergleich des mittleren Windungsumfangs (Coil Girth) der Polytänochrosomen aus den Speicheldrüsenkernen von Phryne cincta mit dem mittleren Bruchabstand (Inversion Length) von kleinen, strahleninduzierten Inversionen (Definition, siehe Beschreibung Abb. 17).

Geschlechtschromosomenkonstitution

bs : $X_b X_b$, $X_b Y$

as : $X_a X_a$, $X_a Y$

ab : $X_a X_b$



gen Typ des X-Chromosoms bestimmt und ist unabhängig vom Geschlecht. Bei geschlechtschromosomal hybriden Weibchen ergibt sich ein intermediärer Windungsumfang (Abb. 18, Tab. 15).

10. Lage und Länge spontan aufgetretener Inversionen

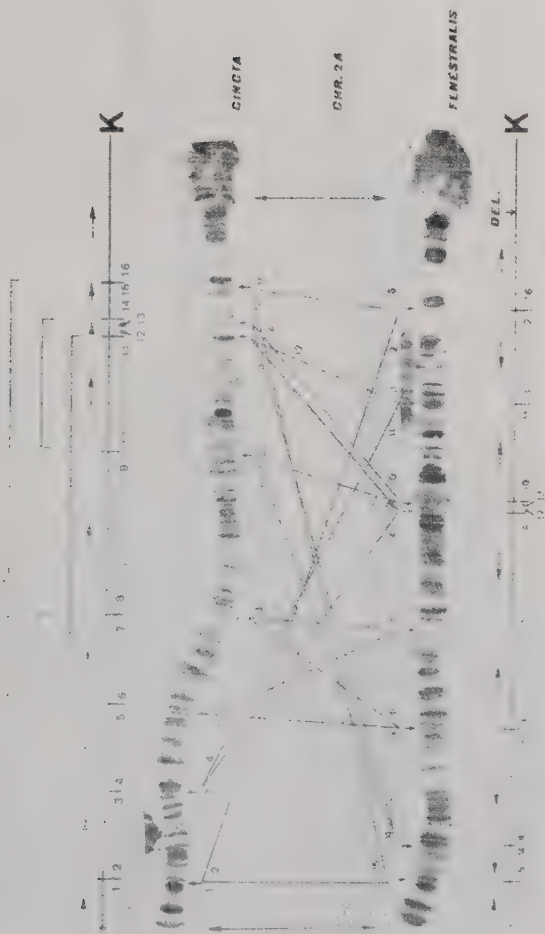
Die beiden Arten Phryne cincta (bs) und P. fenestralis wurden anhand von Zeichnungen der äußeren, männlichen Geschlechtsorgane der Imagines (Edwards 1923) bestimmt. Eine Artkreuzung zur Untersuchung von Bastardlarven ist nicht möglich.

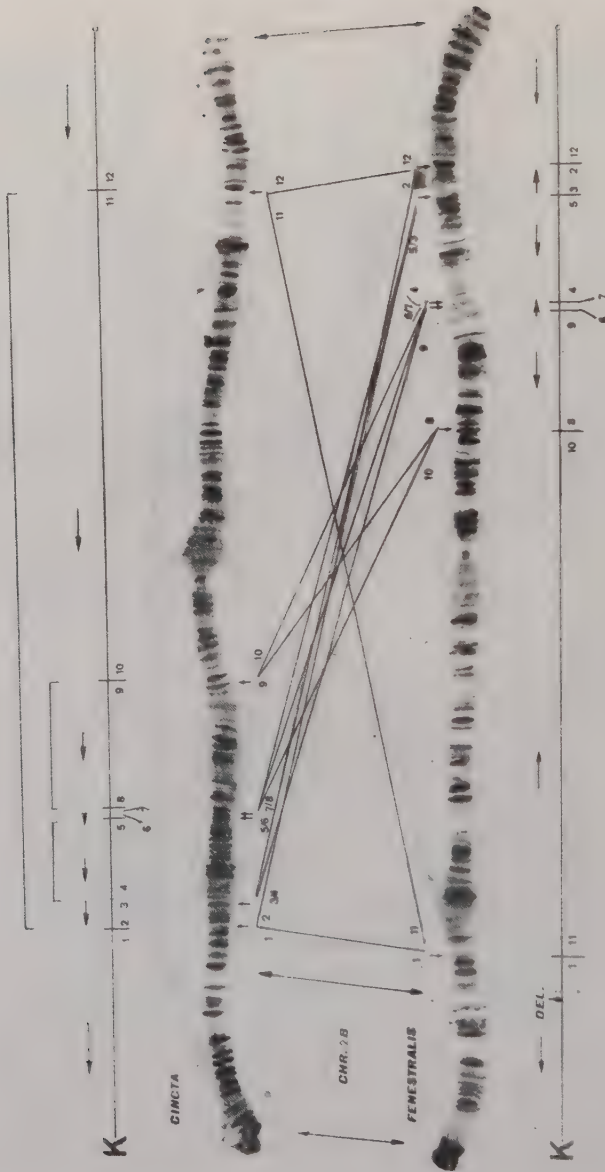
Die Mitosechromosomen beider Arten zeigen keine Unterschiede. Artspezifische Unterschiede ergeben sich erst aus der vergleichenden Analyse der Polytänchromosomen. Insgesamt wurden 16 parazentrische Inversionen durch den Bandenmustervergleich aufgefunden. Dazu wurden die Grenzen homologer Bereiche in beiden Arten durch Linien verbunden und jeder ermittelte Bruchort mit den dazugehörenden zwei Bruchenden bei P. cincta fortlaufend nummeriert (Abb. 19). Die notwendige Anzahl von Inversionen und die Kennzeichnung zusammengehörender Bruchstellen, um von der Standardbandenanordnung bei P. cincta zu der Bandenanordnung bei P. fenestralis zu gelangen, ist in eckigen Klammern angegeben. Die Länge dieser Klammern gibt nicht immer auch gleichzeitig die Länge des invertierten Bereiches an, da in einigen Fällen durch überlappende Inversionen die relative Lage zusammengehörender Bruchorte verschoben wurde. Die Folge des Auftretens von Inversionen, die auf einfachste Weise das jeweilige Bandenmuster bei einer gegebenen Art in das der anderen umwandeln würde, ist in Abb. 20 wiedergegeben.

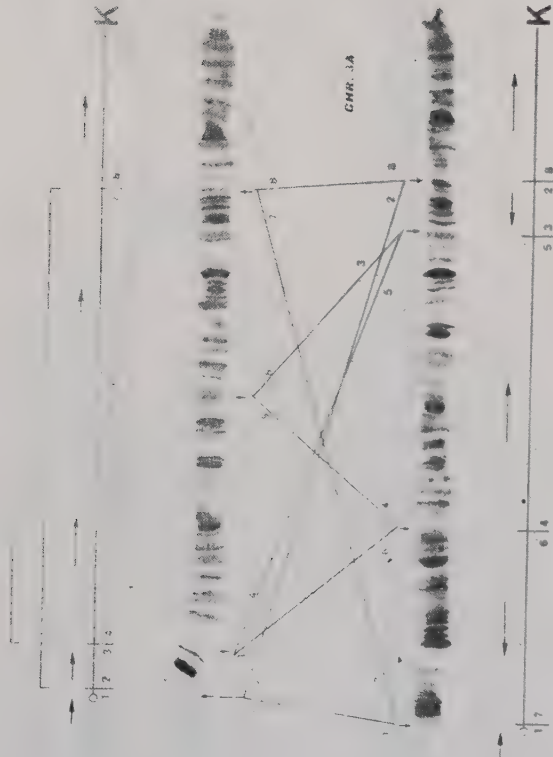
Abbildung 19

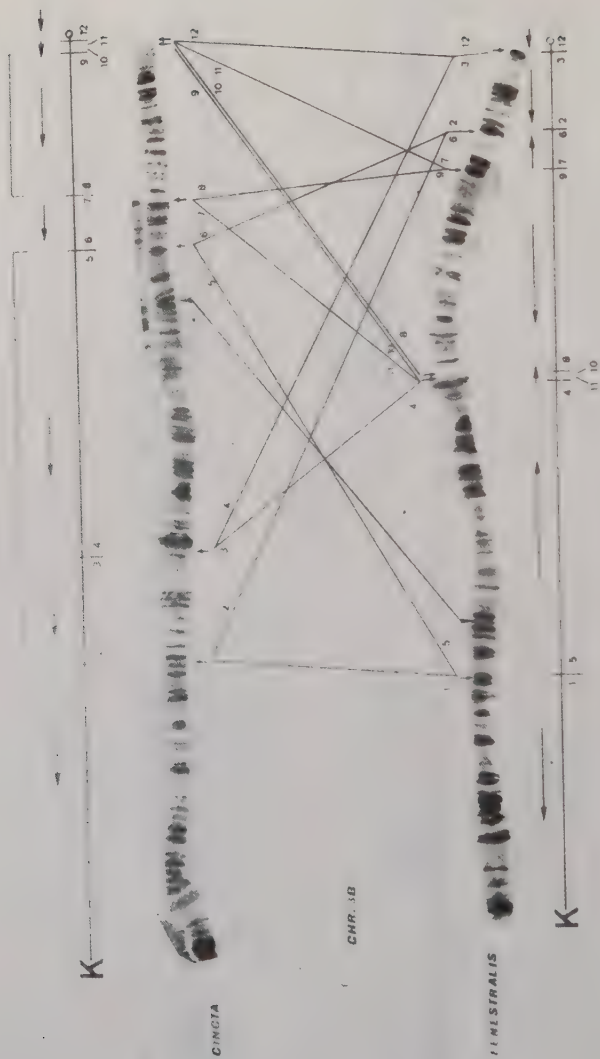
Vergleich des Bandenmusters der Polytänchromosomen von Phryne cincta mit dem von Phryne fenestralis. Die Grenzen homologer Bandenmuster in beiden Arten sind durch Linien verbunden. Jeder Bruchort wird durch zwei aufeinanderfolgende Zahlen markiert. Die Pfeile über den Chromosomen zeigen die Folge des Standardbandenmusters bei Phryne cincta an. Die Grenzen und die Anzahl der aufgetretenen Inversionen sind über den Chromosomen von Phryne cincta eingetragen. Pfeile weisen auf Einzelbandveränderungen hin.

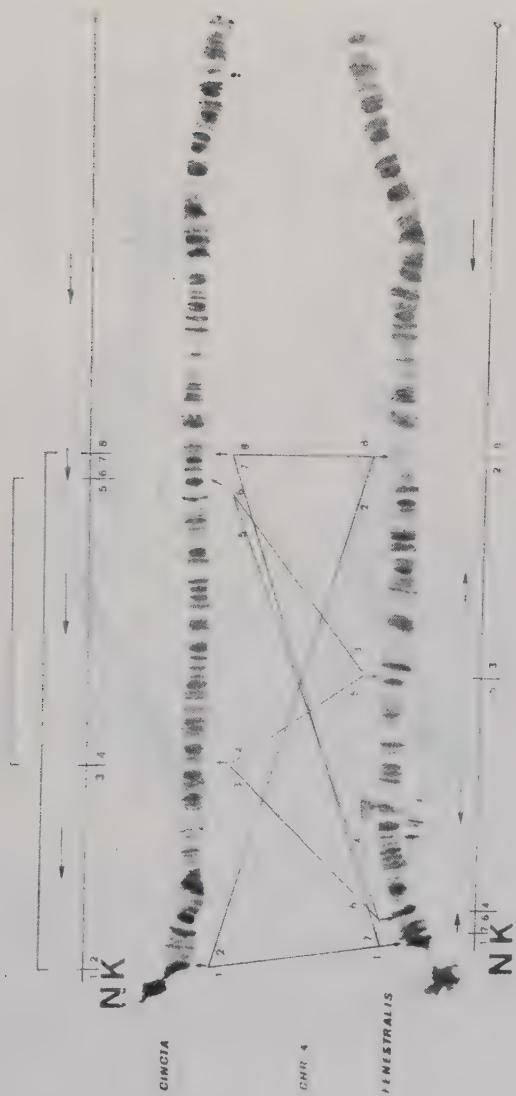
- a) Chromosom 2, a-Arm
- b) Chromosom 2, b-Arm
- c) Chromosom 3, a-Arm
- d) Chromosom 3, b-Arm
- e) Chromosom 4
- f) Chromosom X











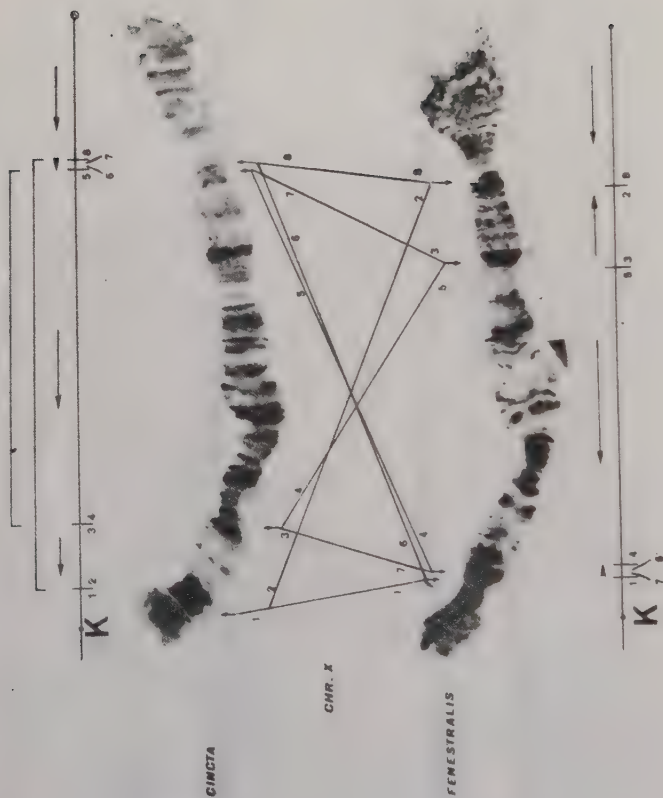
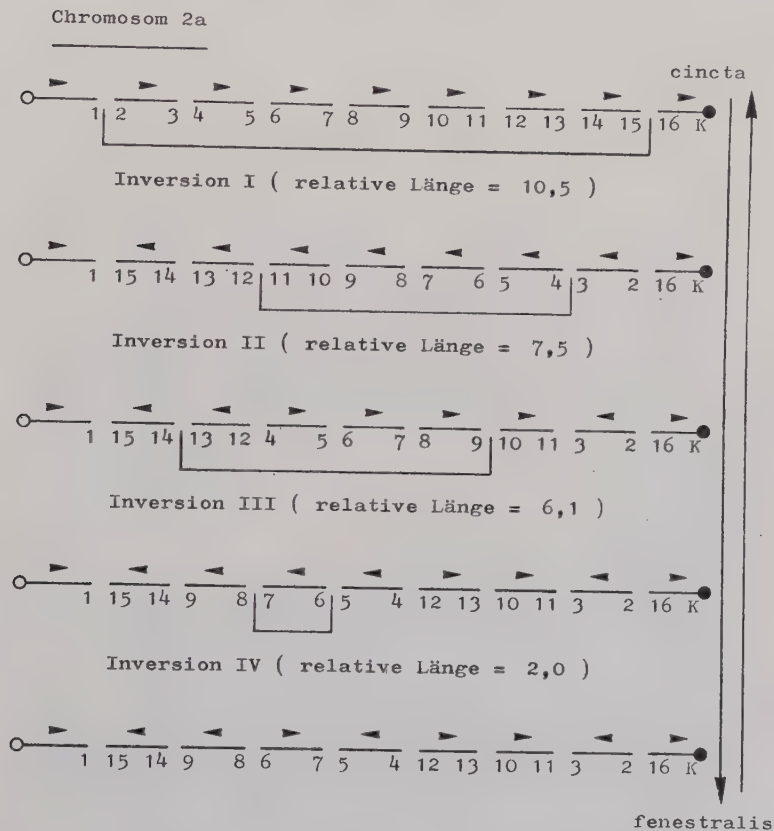
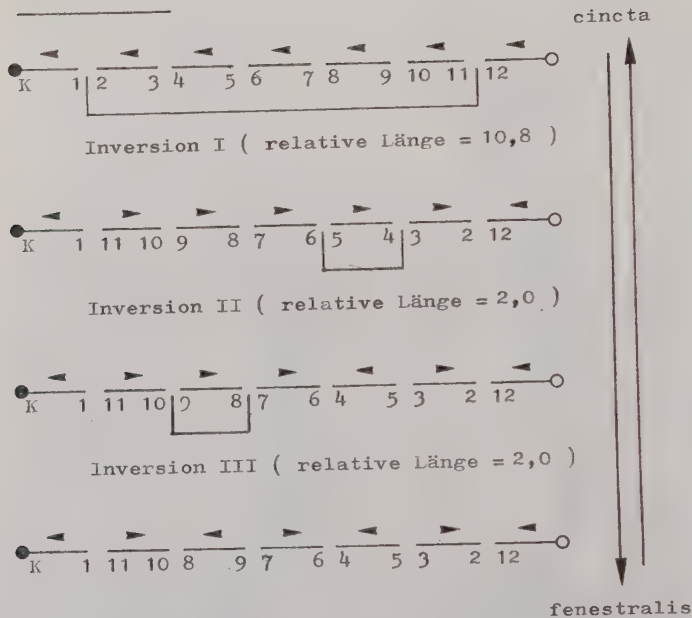


Abbildung 20

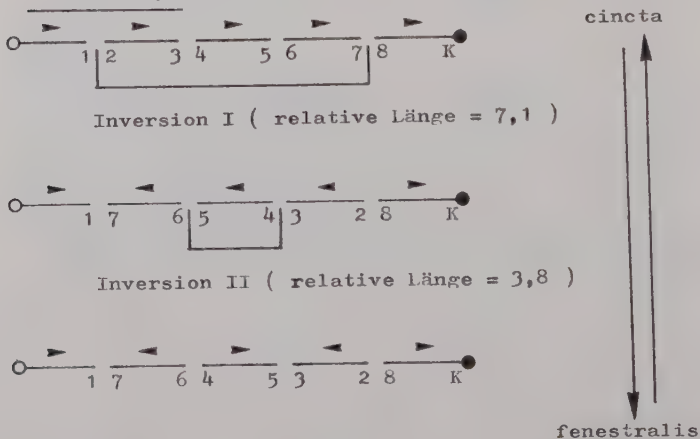
Lage und Länge (Karteneinheiten) spontan aufgetretener Inversionen bei *Phryne cincta* und *P. fenestralis*.
Mögliche Folge des Auftretens von Inversionen, die das jeweilige Bandenmuster bei einer gegebenen Art in das der anderen umwandeln.



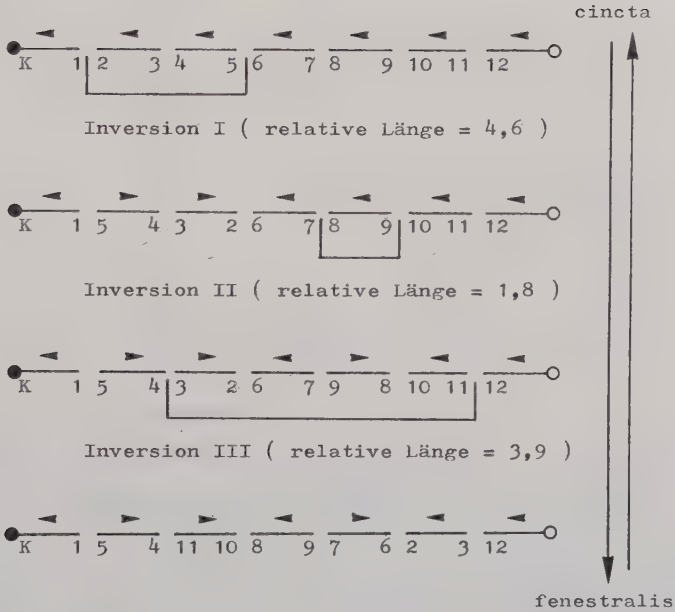
Chromosom 2b



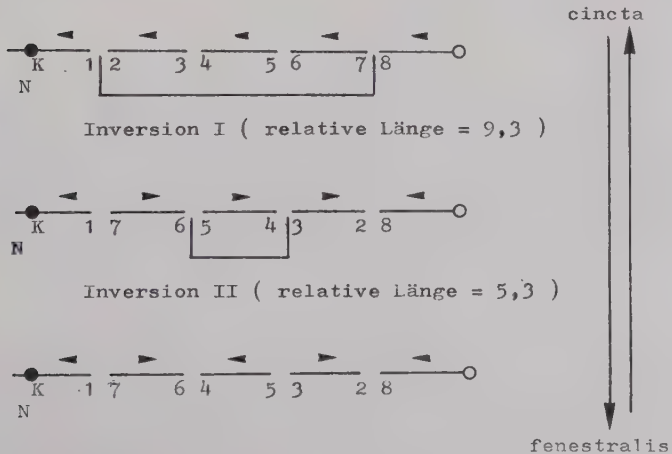
Chromosom 3a



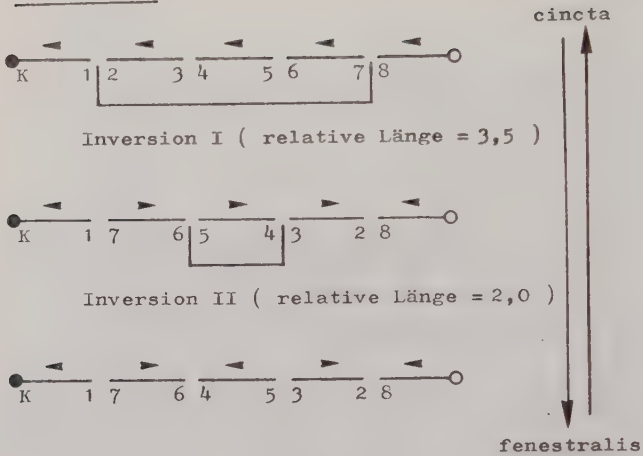
Chromosom 3b



Chromosom 4



Chromosom X



Zusammenfassung der Inversionen in 11 Längenklassen

Anzahl der Inversionen	0	5	0	3	2	1	1	1	1	0	2
Inversions- länge X	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11

$\bar{X} = 5,2$

In Abb. 20 bezieht sich die relative Länge jeder einzelnen Inversion auf Abschnittslängen in der Chromosomenkarte.

11. Beziehung der chromosomalen Mutationsrate zur Eisterberate

Sowohl bei der Induktion von Chromosomenaberrationen als auch bei dominant-letalen Mutationen ergibt sich nach Spermienbestrahlung ein konstanter Sensitivitätsunterschied zwischen dem bs- und as-Stamm von Phryne cincta (vgl. 5.). Aus Abb. 21 ist ersichtlich, daß balancierte chromosomale Aberrationen und dominant-letale Mutationen in einer bestimmten Weise miteinander korreliert sind: Die Beziehung der chromosomal mutierten Spermien (Tiere) ^{zur Überlebensrate} wird in beiden Stämmen von den gleichen Gesetzmäßigkeiten bestimmt. Auch der durch den Faktor 3 charakterisierte Sensitivitätsunterschied zwischen Phryne und Drosophila ist in der Beziehung der mutierten Spermien zur Überlebensrate nicht mehr sichtbar. Vielmehr ergeben sich identische Beziehungen bei Drosophila und Phryne. Die geringfügig systematische Abweichung der Drosophila-Werte von der Ausgleichsgeraden (Abb. 21) kann darauf zurückgeführt werden, daß bei Drosophila melanogaster (Oregon) nicht nur reife Spermien, sondern auch zum großen Teil späte Spermatiden bestrahlt wurden. Dies geht aus der Untersuchungsmethode von Bauer (1939) hervor. In Abb. 21 wurde deshalb die Überlebensrate nach Bestrahlung später Spermatiden von Drosophila melanogaster (Oregon) (Sankaranarayanan 1974) zur chromosomalen Aberrationsrate (Bauer 1939) in Beziehung gesetzt.

Die ähnliche Reaktionsweise von Phryne und Drosophila geht in diesem Zusammenhang viel weiter - bis zur Ver-

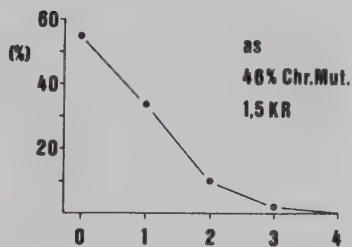
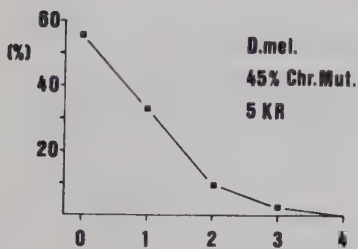
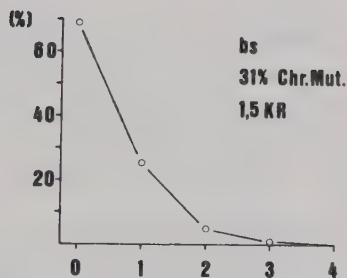
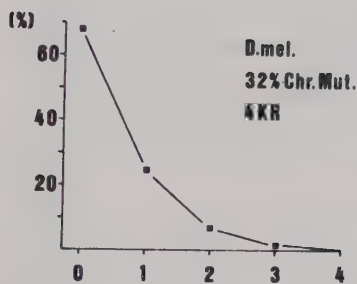
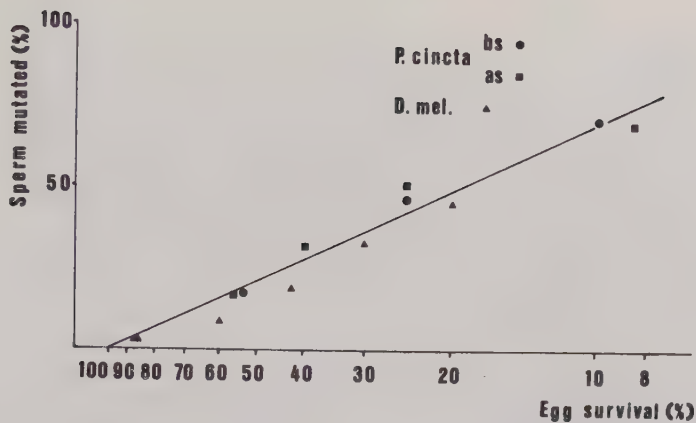
Abbildung 21

Beziehungen der Mutationsraten (Sperm mutated) zur Überlebensrate (Egg survival) nach Bestrahlung von Spermien des as- und bs-Stammes von Phryne cincta und von Drosophila melanogaster.

Werte für die chromosomalen Mutationsraten bei Drosophila aus: Bauer (1939), für die Überlebensrate aus: Sankaranarayanan (1974).

Abbildung 22

Gegenüberstellung der Verteilungen von chromosomalen Mutationen pro Spermium nach Bestrahlung von Spermien des as- und bs-Stammes von Phryne cincta und von Drosophila melanogaster (Bauer 1939), jeweils bei der Dosis, die bei Phryne und Drosophila die gleiche Mutationsrate induziert.

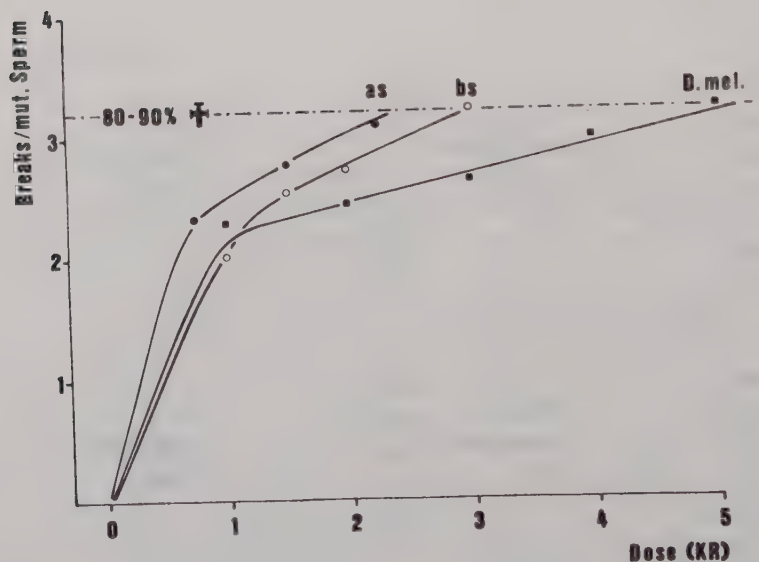


Mutations/Sperm

Abbildung 23

Mittlere Anzahl der Bruchstellen in den mutierten Spermien (Breaks/mut.Sperm) in Abhängigkeit von der Dosis. Die Kurven für den bs- und as-Stamm von Phryne cincta, wie die für Drosophila melanogaster, schneiden jeweils die Linie (---) bei der ca. 3,2 Brüche pro Spermium, bzw. 80 - 90 % dominant-Letale induziert werden.

Mittlere Bruchzahl bei Drosophila aus: Bauer (1939),
Werte für dominante Letalität bei Drosophila aus:
Sankaranarayanan (1974).



teilung der Chromosomenmutationen in den Spermien. Unabhängig vom Sensitivitätsunterschied ergibt sich eine fast vollständige Übereinstimmung der Verteilungen bei etwa gleichen chromosomalen Mutationsraten in Drosophila und Phryne (Abb. 22).

Nach Abb. 22 ist zu erwarten, daß auch die mittlere Anzahl der Bruchstellen in den mutierten Spermien bei Drosophila bzw. bei den unterschiedlich sensitiven Stämmen von P. cincta, in einem sehr ähnlichen Verhältnis zur dominanten Letalität steht, Abb. 23 bestätigt diese Vermutung.

Bei Phryne cincta kann davon ausgegangen werden, daß in den Riesenchromosomen nahezu alle balancierten chromosomalen Aberrationen nach Bestrahlung der Spermien erfaßt werden können, da zum einen durch die Kältebehandlung der Larven ein hoher Polytäniegrad und eine gute Querscheibendifferenzierung erreicht wird und zum anderen die Chromosomen nicht in einem Sammelchromozentrum verkoppelt vorliegen. Aberrationen, die das Y-Chromosom betreffen, können, wegen der Kleinheit dieses Chromosoms in der Mitose, nur einen sehr geringen Anteil am Gesamtmutationsgeschehen haben. Zudem sind Y/Autosomen-Translokationen in den Riesenchromosomen relativ auffällig.

Es wurde deshalb versucht, die in Abb. 21 - 23 dargestellte Beziehung der chromosomalen Aberrationen zur dominanten Letalität zahlenmäßig zu bestimmen. Dabei wurde davon ausgegangen, daß die Entstehung balancierter Mutationen und dominant-letalere Mutationen, auf eine gemeinsame Basis zurückzuführen ist.

Tabelle 1

Erwartete Anzahl von Restitutionen (R), sichtbar chromosomal veränderten Tieren (M) oder letalen Tieren (LK) bei 1 - 6 zweifach getroffenen Kontaktpunkten (Sites) pro Spermium. Die Zahlen für R, M und LK in Spalte 2 ergeben sich aus der Annahme, daß die Reparaturvorgänge in jedem Site im Mittel zu 1 Restitution, 1 balancierten Chromosomenmutation, bzw. 4 unbalancierten Chromosomenmutationen führen.

Nach der Reparatur von 1 - 6 Sites überleben die Tiere, die entweder 1 - 6 balancierte Chromosomenmutationen erhalten haben oder bei denen in einem, bzw. in mehreren Sites Restitutionen auftraten, in anderen Sites balancierte Chromosomenmutationen (Teilrestitutionen) oder bei denen alle Sites restituiert wurden. Die erwartete Anzahl von Restitutionen, Teilrestitutionen oder balancierten Chromosomenmutationen bei 1 - 6 Sites pro Spermium ist in Spalte 3 angegeben.

Tabelle 1

Anzahl der Kontaktpunkte		Verhältnis von <u>Restitution</u> zu sichtbarer <u>Mutation</u> zu <u>letal</u> er <u>Kombination</u>	Aufgliederung der teil-resti- tuierten Kombinationen
n	KTP	R : M : LK	
1	KTP	1 : 1 : 4	1 R 1 M
2	KTP	1 : 3 : 32	1 R-R 2 M-R 1 M-M
3	KTP	1 : 7 : 208	1 R-R-R 3 M-R-R 3 M-M-R 1 M-M-M
4	KTP	1 : 15 : 1280	1 R-R-R-R 4 M-R-R-R 6 M-M-R-R 4 M-M-M-R 1 M-M-M-M
5	KTP	1 : 31 : 7744	1 R-R-R-R-R 5 M-R-R-R-R 10 M-M-R-R-R 10 M-M-M-R-R 5 M-M-M-M-R 1 M-M-M-M-M
6	KTP	1 : 63 : 46592	1 R-R-R-R-R-R 6 M-R-R-R-R-R 15 M-M-R-R-R-R 20 M-M-M-R-R-R 15 M-M-M-M-R-R 6 M-M-M-M-M-R 1 M-M-M-M-M-M

Bei der Bestrahlung mit der niedrigsten Dosis von 1 KR bei bs und 0,75 KR bei as wird in fast allen chromosomal veränderten Tieren höchstens eine 2-Bruch-Aberration aufgefunden.

Da parallel zu den Chromosomenanalysen die dominante Letalität bestimmt wurde, läßt sich empirisch die chromosomale Mutationsrate mit der Eisterberate in Übereinstimmung bringen, wenn man annimmt, daß zusätzlich zu jeder ausgewerteten Chromosomenaberration eine Restitution und 4 weitere unbalancierte Aberrationen (Deletionen, dizentrische Chromosomen) entstanden sind. Bei 2 oder mehreren betroffenen Kontaktbereichen (Sites) pro Spermium kann bereits eine letale Rekombination die Beobachtung von ebenfalls aufgetretenen balancierten Aberrationen unmöglich machen. Bei der Reparatur von mehreren unabhängigen Sites verschiebt sich damit das Grundverhältnis von 1 : 1 : 4 für Restitution : balancierter Mutation : letaler Kombination zugunsten der insgesamt letalen Kombinationen. Wahrscheinlichkeitstheoretisch sollte nach der Reparatur von n 2-Bruch-Sites das Gesamtverhältnis für Restitution (R) : chromosomal mutiertem Tier (M) : letaler Kombination (LK) den Verhältnissen in Tab. 1, Spalte 2, entsprechen. Darin ist $R = 1^n$; $M = 2^2 - 1$ und $L = (6^n - 1) - (2^n - 1)$. Mit den Verhältniszahlen aus Tab. 1, Spalte 2, wurden bei jeder Dosis aus dem jeweiligen Anteil der Nachkommen mit 1 - 4 Chromosomenmutationen (2 - 8 Brüche, Tab. 7), die Anzahl der Zygoten mit einem letalen Chromosomensatz berechnet. Schwierigkeiten bei der Klassifizierung der Nachkommen in 4 Klassen bereiten 3-Bruch-Aberrationen, die einen höheren Letalitätsanteil haben

als 2-Bruch-Aberrationen, sie wurden deshalb in die nächsthöhere Klasse eingeordnet.

Tabelle 2 Vergleich der berechneten mit der beobachteten, dominanten Letalität

Stamm	Dosis	berechnete Letalität	beobachtete Letalität (unkorrigiert)
as	0,75 KR	48,7 %	48,1 %
as	1,50 KR	79,4 %	75,6 %
as	2,25 KR	89,5 %	90,8 %
bs	1,50 KR	68,1 %	62,2 %

Bei den berechneten Letalitätsraten war keine Korrektur durch die Kontrollsterblichkeit möglich. Es wurden zum Vergleich mit der beobachteten Letalitätsrate die unkorrigierten Werte aus Tab. 8 verwendet. Die gute Übereinstimmung der berechneten mit den beobachteten Sterberaten überrascht insofern, als bei den Verhältnissen von M : LK in Tab. 1, Spalte 2, das Auftreten von teilrestituierten Kombinationen nicht berücksichtigt wurde. Diese in Tab. 1, Spalte 3, aufgeführten Teilrestitutionen führen zur falschen Klassifizierung eines Tieres mit z. B. 2 unabhängigen Chromosomenmutationen.

2 Aberrationen können aus der Reparatur von 2 Sites pro Kern hervorgehen oder aus 3 Sites pro Kern bei 1 Restitution in einem Site oder aus 4 Sites pro Kern bei 2 Restitutionen. Ab 5 Sites pro Kern dürfte diese Drift von primär höheren zu niedrigeren, experimentell erfaßbaren Siteanzahlen kaum eine Rolle spielen, denn die Entstehungswahrscheinlichkeit für nur 1 unbalancierte Aberration wird bei 5 Sites sehr groß (Tab. 1).

Tatsächlich wurde auch bisher unter 850 chromosomal mutierten Tieren nur eines mit 5 unabhängigen Aberrationen gefunden.

Bei den Klassen 1 - 4 Sites pro Kern scheint die Drift von höheren zu niedrigeren Klassen keinen Einfluß auf die Berechnung der Gesamtlethalität zu haben.

Bei Einzelberechnung der Letalität höherer Klassen resultieren driftbedingt zu niedrige Werte, die durch entsprechend höhere Werte bei den niedrigen Klassen kompensiert werden könnten.

Diese Annahme kann überprüft werden, indem für die Dosis 2,25 KR bei Δ die Driftverhältnisse bei der Berechnung der Letalität jeder Klasse berücksichtigt werden. Ausgehend von der Anzahl der Tiere mit 4 Chromosomenaberrationen sollten die nach Tab. 1 daneben aufgetretenen, teilrestituierten Tiere in den entsprechend niedrigeren Klassen nicht mehr berücksichtigt werden. Dann stehen jedem 4fach chromosomal mutierten Tier 1280 letale Zygoten gegenüber. Entsprechendes gilt für die Letalitätsberechnung bei den folgenden Klassen 3, 2 und 1.

Tab. 3 gibt das Rechenschema zur Berechnung der Anzahl letaler Embryonen wieder. Mit den 111 analysierten Tieren ergibt sich eine berechnete Letalität von 94,6 %. Diesem Wert steht der experimentell ermittelte von 90,8 % gegenüber.

im Vergleich mit dem experimentellen Wert als weiterer Hinweis für die Richtigkeit des Grundverhältnisses von 1 : 1 : 4 für R : M : LK betrachtet werden.

Damit sollte es möglich sein, aus der primären Verteilung der zweifach getroffenen Sites, unter Berücksichtigung der Driftverhältnisse nach der Reparatur, die sekundäre Verteilung der balancierten Aberrationen in den Nachkommen abzuschätzen.

Als primäre Häufigkeitsverteilung wurde eine Binomialverteilung angenommen, die durch die beiden Parameter p (Wahrscheinlichkeit für 2 Treffer in einem Site) und N (maximale Site-Anzahl) charakterisiert wird. Die Wahrscheinlichkeit p für 2 Treffer pro Site wurde bereits durch die Schätzung der Trefferkonstanten k' (siehe Abschnitt 8) bei as und bs mit

$$p = (1 - e^{-k \cdot D})^2$$

ermittelt. Da sich die Werte für k bei as (0,00036) und bs (0,00029) nicht signifikant voneinander unterscheiden, basieren die geprüften Binomialverteilungen auf dem mittleren Wert k = 0,000325. Zur Prüfung der Auswirkung unterschiedlicher Site-Zahlen (N) wurde ein Umrechnungsschema verwendet, das sowohl den Verlust der Zyoten mit letalem Chromosomensatz als auch die durch Teilrestitution hervorgerufenen Driftverhältnisse berücksichtigt (Tab. 4). Z. B. werden nach zufälligem Verbinden der Bruchenden in 3 unabhängigen Sites (Klasse 3, Tab. 4) mit dem Grundverhältnis 1 : 1 : 4 für R : M : LK $6^3 = 216$ Kombinationsmöglichkeiten erwartet. Darunter sollte 1 Tier mit 3 balancierten Mutationen, 3 Tiere mit 2 balancierten Mutationen und 1 Restitution (Drift, $3 \rightarrow 2$), 3 Tiere mit 1 balancierten Mutation und 2 Restitutionen (Drift, $3 \rightarrow 1$) und 1 Tier mit 3 Restitutionen

(Drift, $3 \rightarrow 0$) auftreten. Die aus den jeweiligen Binomialverteilungen bestimmten Klassenhäufigkeiten sind als Symbole dargestellt. Berücksichtigt wurden nur 6 Klassen (Klasse 0 - 5), da bei höheren Klassen nahezu keine Überlebenden mehr zu erwarten sind.

Die nach diesem Rechenschema erhaltene, theoretische Verteilung der Aberrationen in den Überlebenden wurde mittels des χ^2 -Verfahrens mit der beobachteten Verteilung verglichen.

Angesichts der komplizierten Driftverhältnisse in Tab. 4 überrascht das Ergebnis der Umrechnung im Vergleich mit den beobachteten Werten (Abb. 24). Die beste Übereinstimmung wird mit $N = 13$ bei bs und $N = 20$ bei as erzielt. Selbst bei 3 KR (bs), bzw. bei 2,25 KR (as) ergeben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den theoretischen und beobachteten Verteilungen. Es kann jedoch nicht übersehen werden, daß die Güte der Anpassung von der niedrigeren zur höchsten Dosis kontinuierlich schlechter wird. Diese Tendenz wiederholt sich im Vergleich der beobachteten- mit den berechneten Überlebensraten (= Summe der absoluten Häufigkeiten in jeder Klasse). In Abb. 25 sind die nach Umrechnung der primären Binomialverteilungen bei bs erwarteten Überlebenden in jeder Klasse graphisch dargestellt und in Tab. 5 die Summe der einzelnen Klassenhäufigkeiten im Vergleich mit der beobachteten Überlebensrate.

Tabelle 4

Rechenschema zum Umrechnen einer gegebenen Binomialverteilung zweifach getroffener Sites (Primärverteilung) in die erwartete Sekundärverteilung chromosomaler Mutationen (effektive Sites) in den Überlebenden. Die einzelnen Häufigkeiten in Klasse 0 - 5 der Primärverteilung sind durch Symbole dargestellt. Bei der Umrechnung werden die Zahlenverhältnisse aus Tab. 1 berücksichtigt.

Die Restitution von einem Site oder von mehreren Sites bei Klasse 1 - 5 der Primärverteilung führt zu einer Verschiebung (Drift) zu niedrigeren, experimentell erfaßbaren Sitezahlen (Chromosomenmutationen). Die aus Tab. 1 erwarteten Verschiebungen von höheren zu niedrigeren Siteklassen sind z. B. bei Klasse 5 unter Drift 5 aufgeführt. Die Summe jeder Zeile ergibt die erwartete Häufigkeit chromosomaler Mutationen in Klasse 0 - 5 der Sekundärverteilung.

Tabelle 4

Primärverteilung Klasse Häufigkeit	Drift 1	Drift 2	Drift 3	Drift 4	Drift 5	Sekundärverteilung
0	$\frac{1}{6} \bigcirc$	$\frac{1}{36} \square$	$\frac{1}{216} \diamond$	$\frac{1}{1296} \triangle$	$\frac{1}{7776} \nabla$	Summe Klasse 0
1	$\frac{1}{6} \bigcirc$	$\frac{2}{36} \square$	$\frac{2}{216} \diamond$	$\frac{4}{1296} \triangle$	$\frac{2}{7776} \nabla$	Summe Klasse 1
2	$\square$	$\frac{1}{36} \square$	$\frac{2}{216} \diamond$	$\frac{6}{1296} \triangle$	$\frac{10}{7776} \nabla$	Summe Klasse 2
3	$\diamond$		$\frac{1}{216} \diamond$	$\frac{4}{1296} \triangle$	$\frac{10}{7776} \nabla$	Summe Klasse 3
4	$\triangle$			$\frac{1}{1296} \triangle$	$\frac{2}{7776} \nabla$	Summe Klasse 4
5	∇				$\frac{1}{7776} \nabla$	Klasse 5

Abbildung 24

Vergleich der prozentualen Anteile der Aberrationen pro Spermium in 1 bis 4 Klassen im as- und bs-Stamm von Phryne cincta mit den erwarteten Häufigkeiten (gestrichelt) aus den umgerechneten primären Binomialverteilungen (siehe Text).

Die beste Übereinstimmung mit den experimentellen Werten bei bs wurde nach Umrechnung der Binomialverteilung mit $N = 13$ und $p = (1 - e^{-k \cdot D})^2$ erreicht, bei as mit $N = 20$ und $p = (1 - e^{-k \cdot D})^2$

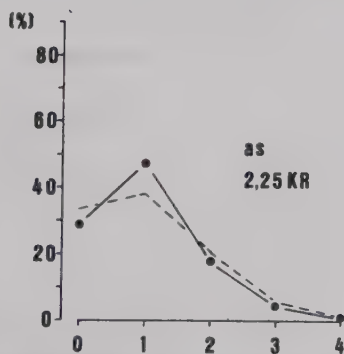
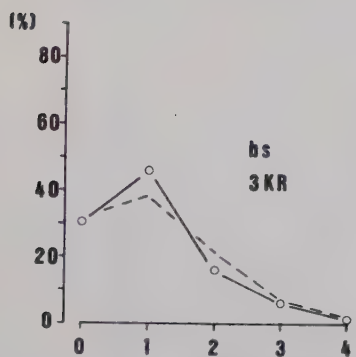
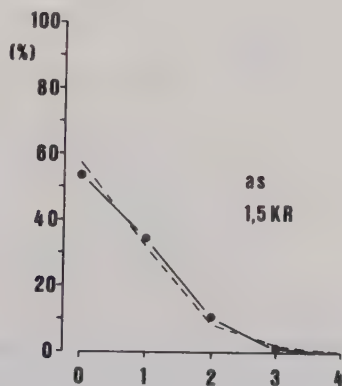
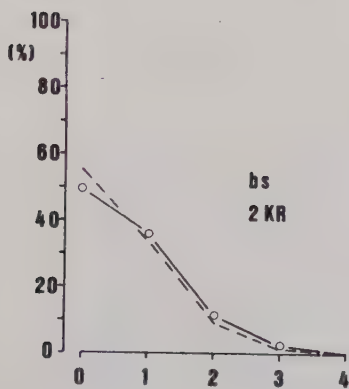
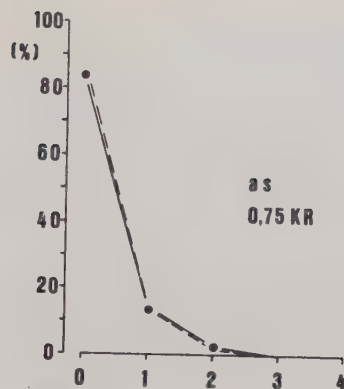
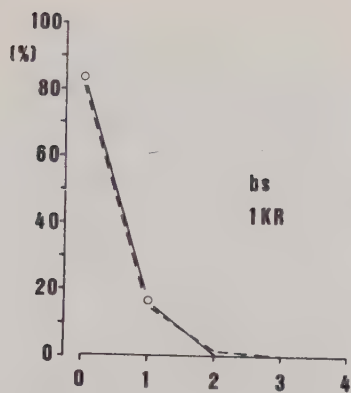
N = maximale Site-Anzahl

p = Wahrscheinlichkeit für 2 Treffer
pro Site

k = Trefferkonstante = 0,000325

D = Dosis

Die Abweichungen der theoretischen von den experimentellen Verteilungen sind nicht signifikant.



Aberrations/Sperm

Abbildung 25

Primäre Verteilungen (gestrichelt) der zweifach getroffenen Sites (Affected Sites) und die nach Umrechnung (siehe Text und Tabelle 4) resultierenden Verteilungen der Aberrationen pro Spermium. Die gezeichneten primären Binomialverteilungen ergeben bei $N = 13$ und $p = (1 - e^{-k \cdot D})^2$ die beste Übereinstimmung mit den experimentellen Werten.

N = maximale Site-Anzahl

p = Wahrscheinlichkeit für 2 Treffer
pro Site

k = Trefferkonstante = 0,000325

D = Dosis (R)

Bei der Dosis 3 KR sind die beiden Komponenten Drift und Letalität (Lethality) schematisch eingezeichnet, die bei der Verformung der primären Verteilung (prim. Distribution) zu der Verteilung in den Überlebenden (Survival) berücksichtigt wurden.

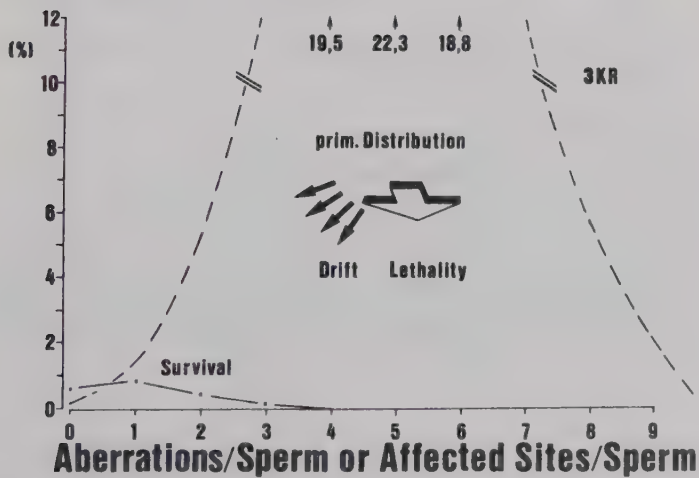
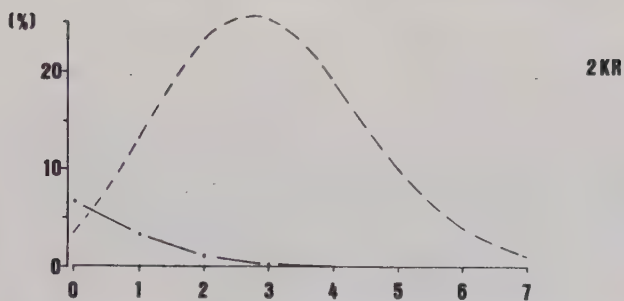
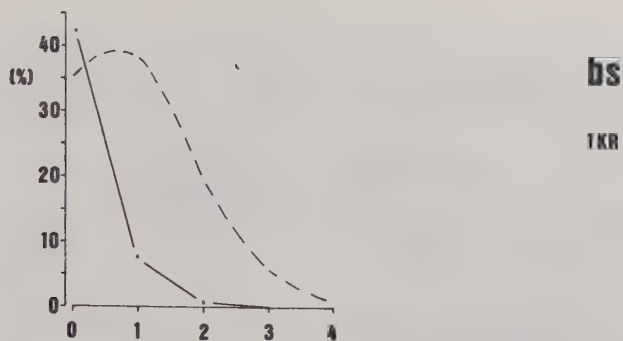


Tabelle 5 Vergleich der beobachteten- mit den berechneten Überlebensraten (siehe Text)

Stamm	Dosis	berechnete Überlebensrate	beobachtete Überlebensrate (unkorrigiert)
bs	1 KR	50,4 %	54,1 %
bs	2 KR	11,6 %	24,0 %
bs	3 KR	2,0 %	8,6 %
as	0,75 KR	53,0 %	51,9 %
as	1,50 KR	12,3 %	24,4 %
as	2,25 KR	1,9 %	9,2 %

Tab. 5 zeigt, daß bei höheren Dosen die beobachtete Überlebensrate größer ist als theoretisch erwartet. Aus dem Vergleich der beobachteten relativen Häufigkeiten chromosomal mutierter Tiere mit den berechneten- (Abb. 24) kann wiederum das Grundverhältnis 1 : 1 : 4 für R : M : LK abgeleitet werden.

12. Embryonale Sterberate nach Behandlung der Spermien mit Trenimon, Natriumfluorid oder mit der Kombination aus beiden Substanzen

Behandlung reifer Spermien von Phryne c. mit Trenimon führt bei beiden Stämmen zu einer eindeutigen Dosis-effektbeziehung für dominant-letale Mutationen, wobei der as-Stamm signifikant sensitiver reagiert als der bs-Stamm (Abb. 26, Tab. 16). Die Dosis-effektbeziehungen beginnen jeweils bei etwa 10^{-6} M Trenimon und treffen sich wieder bei 10^{-3} M. Der Unterschied in der Eisterberate zwischen beiden Stämmen nach Trenimon-Behandlung der Spermien ist auch nach Röntgenbestrahlung in ähnli-

cher Weise sichtbar. Ebenso ist eine höhere Eisterberate bei Phryne im Vergleich zu Drosophila sowohl nach Trenimon- als auch nach Röntgenbestrahlung zu beobachten.

Eine konstante NaF-Konzentration von 10^{-2} M verschiebt in Kombination mit Trenimon die Dosis-effektbeziehungen bei beiden Stämmen um eine 10er-Potenz von 10^{-6} M auf 10^{-5} M.

NaF allein führt bei der gegebenen Konzentration nicht zur Induktion von dominant-letalen Mutationen (Tab. 16):

In Kombination mit Trenimon bedingt NaF lediglich eine Parallelverschiebung der Dosis-effektbeziehungen und läßt damit die Kurvenform und den Sensitivitätsunterschied zwischen den Stämmen unbeeinflusst. Daraus resultiert auch bei verschiedenen Trenimonzentralisationen eine unterschiedliche antimutagene Wirkung des NaF. Bei 10^{-5} M Trenimon wird z. B. die dominante Letalitätsrate von 70 % auf nahezu 0 % erniedrigt. Bei 10^{-4} M Trenimon wird mit der gleichen NaF-Konzentration nur eine Differenz von ca. 20 % erreicht.

13. Häufigkeit verschiedener chromosomaler Aberrationstypen nach Trenimonbehandlung

Unter 208 analysierten Nachkommen Trenimon-behandelter as-Männchen (10^{-5} , 5×10^{-5} M) konnten nur 19 chromosomal veränderte Tiere aufgefunden werden (Tab. 6).

Der chromosomalen Mutationsrate von 9,1 % steht eine Sterberate von 80 - 95 % bei den verwendeten Trenimonzentralisationen gegenüber. Bei einer ähnlichen, durch Röntgenstrahlen induzierten Sterblichkeit wurden dagegen

Abbildung 26

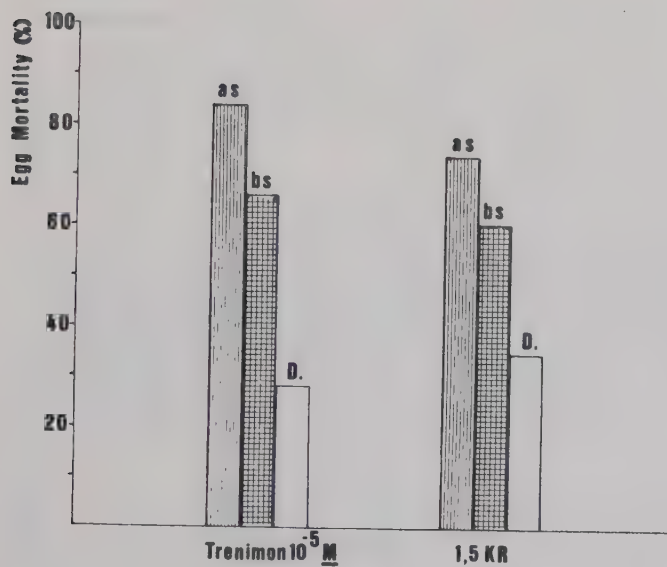
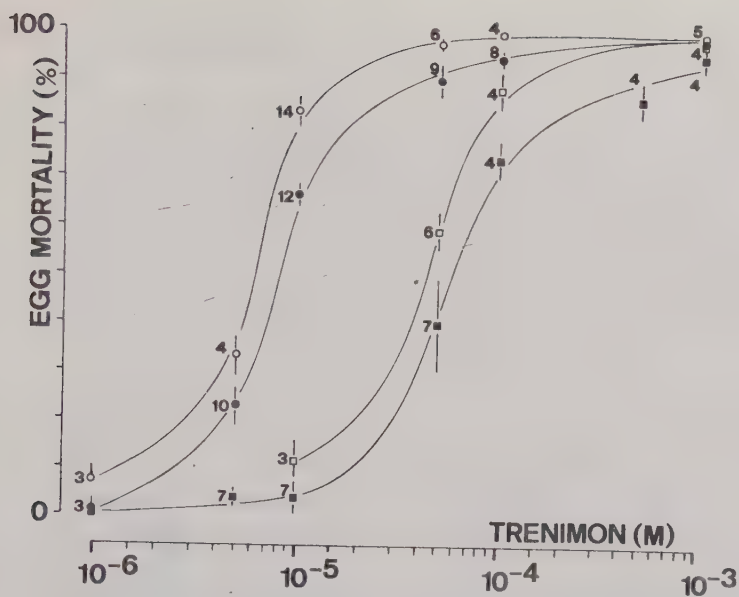
Beziehungen zwischen der Eisterberate (Egg Mortality) und der Dosis nach Behandlung von reifen Spermien des as- und bs-Stammes von Phryne cincta mit Trenimon im Konzentrationsbereich von 10^{-6} bis 10^{-3} M (offene Kreise: bs, geschlossene Kreise: as) und von 10^{-6} bis 10^{-3} M Trenimon in Kombination mit 10^{-2} M Natriumfluorid (offene Quadrate: bs, geschlossene Quadrate: as). Die Zahlen auf der linken Seite eines jeden Punktes geben die Anzahl der getesteten Männchen an.

Fehlerbreite: doppelter Standardfehler.

Abbildung 27

Vergleich der Eisterblichkeit nach Behandlung von reifen Spermien des as- bzw. des bs-Stammes von Phryne cincta und von Drosophila melanogaster mit Trenimon (10^{-5} M) mit der Eisterberate nach Röntgenbestrahlung (1,5 KR).

Sterberaten nach Trenimonbehandlung bei Drosophila aus: Vogel (1973), nach Röntgenbestrahlung aus: Gonzales (1972).



bei ca. 70 % der Nachkommen Chromosomenmutationen gefunden.

Ein weiterer, auffälliger Unterschied zur Röntgenbestrahlung besteht in der außerordentlich hohen Entstehungswahrscheinlichkeit für intrachromosomale Aberrationstypen. Diese nehmen einen Anteil von 81,8 % an der Gesamtmutabilität ein. In den wenigsten Fällen konnte die Aberration in beiden Speicheldrüsen eines Tieres nachgewiesen werden. Bei etwa 60 % aller Aberrationstypen betraf die Veränderung der Speicheldrüsenchromosomen nur eine Hälfte der Drüse und bei weiteren 10 % nur die vordere, bzw. hintere Hälfte des Organs. Unter den Halbseitenmosaiken traten bei 20 % der Tiere in den Kernen einer Speicheldrüse eine Duplikation, in den Kernen der zweiten Speicheldrüse eine Deletion an jeweils homologen Stellen im Genom auf (Dupl. - Del., siehe Tab. 7).

Der mittlere Bruchabstand aus insgesamt 13 beobachteten Inversionen weicht mit einem deutlich geringeren Wert (2,4 Karteneinheiten) von der mittleren Inversionslänge 4,1 nach Röntgenbestrahlung ab, jedoch müßte für eine genauere Längenbestimmung Trenimon-induzierter Inversionen der Rahmen der Untersuchung beträchtlich erweitert werden.

Für weitere Trenimon-Untersuchungen bietet sich insbesondere die Analyse von männlichen Nachkommen an, bei denen eine etwa zweifach höhere Mutationsrate nachgewiesen wurde (Tab. 6). Die statistisch signifikante Abweichung der Mutationsrate in beiden Geschlechtern vom erwarteten 1 : 1 Verhältnis findet eine Parallele in der unterschiedlichen Überlebensrate bei männlichen und

Tabelle 6 Anzahl und Häufigkeit chromosomal mutierter Tiere, Gesamtanzahl der beobachteten Aberrationen, Anzahl und Häufigkeit einzelner Aberrationstypen in den mutierten, bzw. in Mosaiktieren - nach Behandlung von Männchen des as-Stammes von Phryne c. mit 10^{-5} oder 5×10^{-5} M Trenimon.

Stamm	Anzahl der Bruchstellen in F ₁ -Tieren						mutierte Tiere	Aberrationen	
	0	1	2	3	4	6	(N)	(%)	(N)
as-Weibchen	127	0	8	0	1	0	9	6,6	10
as-Männchen	62	0	8	1	0	1	10	13,9	12
	189		16	1	1	1	19	9,1	22

Aberrationstypen	(n)	(%)	Mosaik	(%)
			(n)	
In.	13	59,1	8	36,4
Tr.	4	18,2	3	13,6
Del.	1	4,5	0	0
Dupl.-Del.	4	18,2	4	18,2
Summe	22	100,0	15	68,2

weiblichen Nachkommen. Obwohl bevorzugt männliche Larven abgesammelt wurden, ergibt sich in Tab. 6 ein Geschlechtsverhältnis von 2 : 1 für Weibchen : Männchen.

Zur genaueren Bestimmung der hier angedeuteten Beziehungen ist eine weitere Untersuchung notwendig.

14. Mikroskopische Aufnahmen

Es wurde darauf verzichtet, Beispiele für chromosomale Aberrationstypen, die sich nach Röntgenbestrahlung reifer Spermien ergeben, abzubilden. Eine Zusammenstellung charakteristischer und seltener, strahleninduzierter Chromosomenmutationen ist bei Israelewski (1975) zu finden.

Die folgenden Abbildungen beziehen sich auf Trenimon-induzierte Chromosomenmutationen und auf die Korrelation zwischen Struktureigentümlichkeiten in den Riesenchromosomen und strahleninduzierten Inversionen.

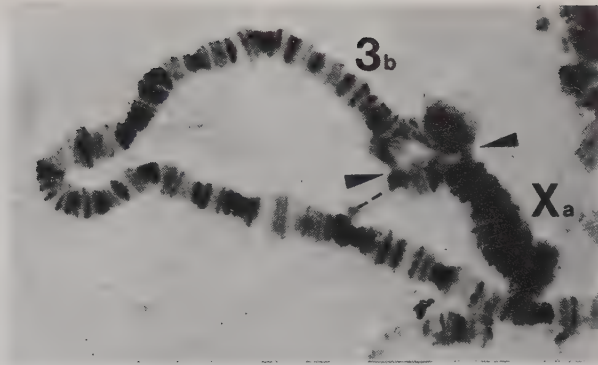
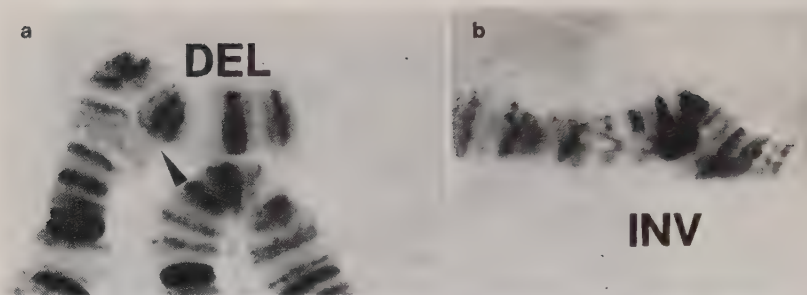


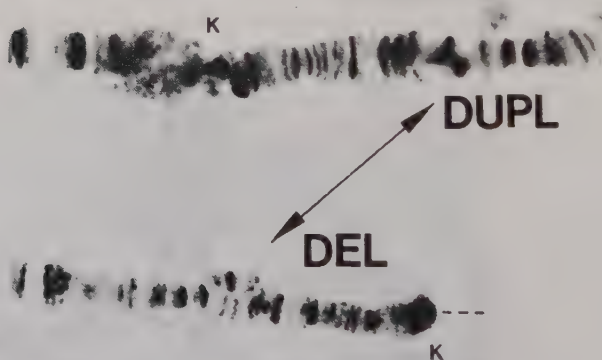
Abb. 28 Trenimon-induzierte reziproke Translokation zwischen Chr. 3(b) und Chr. X_a. Der distale Bereich des X-Chromosoms ist in der Abbildung nicht sichtbar. Die Translokation betraf beide Speicheldrüsen.



Abb. 29 Trenimon-induzierte reziproke Translokation zwischen Chr. 4 und Chr. 2(b). Der Abstand zwischen dem Translokationspunkt und dem Kinetochor in beiden Chromosomen ist etwa gleich groß. Die Translokation betraf nur eine Speicheldrüse.



- Abb. 30 a) Trenimon-induzierte Deletion im distalen Bereich von Chr. 2(a), Bruchabstand 0,6 (Karteneinheiten). Die Deletion betraf beide Speicheldrüsen.
- b) Trenimon-induzierte Inversion im medianen Bereich von Chr. 4, Bruchabstand 0,5. Die Inversion betraf nur eine Speicheldrüse.



- Abb. 31 Trenimon-induzierte Duplikation einer Bande von Chr. 2(b) in einer Speicheldrüse, Deletion der gleichen Bande in der anderen Speicheldrüse.

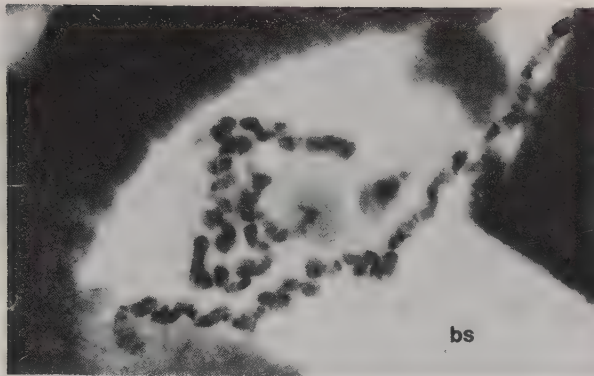


Abb. 32 Strukturelle Organisation der Polytänchromosomen eines ungequetschten Kerns aus den Speicheldrüsen von *Phryne cineta*, bs.



Abb. 33 Im bs-Stamm strahleninduzierte Inversion mit dem Bruchabstand 2,0. Inversionen dieser Größenordnung stellen die am häufigsten beobachtete Aberration dar.



Abb. 34 Spiralstruktur im Chr. 3 (b-Arm) des bs-Stammes
Der Windungsumfang beträgt 2,2 (5 Windungen auf
11 Kartenabschnitte).

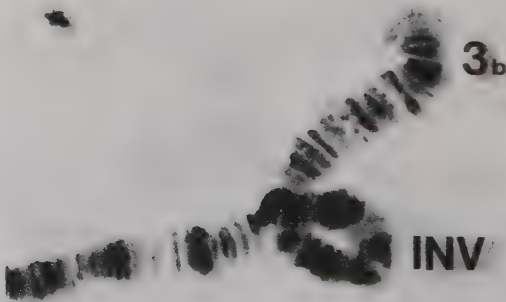


Abb. 35 Charakteristische, strahleninduzierte Inver-
sion im bs-Stamm mit dem Bruchabstand 2,4.

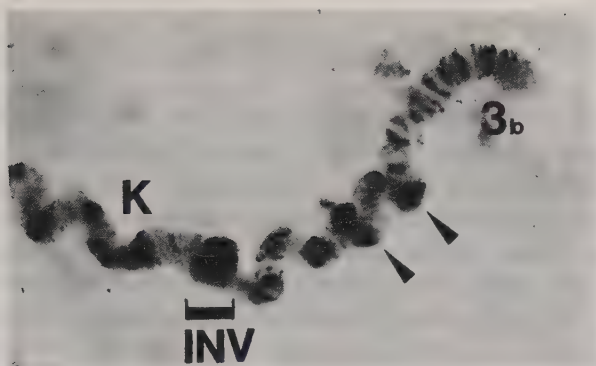


Abb. 36 Relikt von Spiralen in einem hochpolytänen Chr. 3 (b-Arm) des as-Stammes. Die proximal gelegene kleine Inversion ist von einer Windung der folgenden Spiralen kaum zu unterscheiden. Bruchabstand der Inversion 1,5.



Abb. 37 Die gleiche Inversion wie in Abb. 36 aus einem anderen Kern mit gestrecktem Chr. 3.

Diskussion

1. Sensitivitätsunterschied zwischen *Drosophila melanogaster* und *Phryne cincta* nach Bestrahlung

Obgleich jede Zelle eines beliebigen Organismus dem mutationsauslösenden Einfluß von Röntgenstrahlen unterliegt (Oster 1958), variiert ihre Empfindlichkeit gegenüber diesem Agens im Tier- und Pflanzenbereich und in verschiedenen Stadien eines Zellzyklus beträchtlich.

Bei den Dipteren zeichnet sich Phryne im Vergleich mit Drosophila durch eine höhere Strahlensensitivität aus. Während bei Phryne cincta die in reifen Spermien applizierte Dosis von 3 - 4 KR ausreicht, um in der Kreuzung mit einem unbestrahlten Weibchen nahezu alle Zygoten oder Embryonen abzutöten, müssen bei Drosophila melanogaster zur Erzielung des gleichen Effekts 6 - 8 KR in Spermatozoen eingestrahlt werden (Gonzales 1972). Die unterste Sensitivitätsgrenze dürfte mit einer Sterilisationsdosis von 8 - 15 KR bei Culex und Dacus (Olivenerfruchtfliege) erreicht werden (Kilgore und Douth 1967). Auf der anderen Seite ist keine Dipterenart bekannt, bei der weniger als 3 KR zur Sterilisierung von Männchen notwendig sind. Phryne cincta kann somit, neben der Apfelfliege Rhagoletis pomonella (Sterilisationsdosis 3 KR: Myer et al. 1976) und der Zwiebelfliege Hylemya antiqua (Sterilisationsdosis 3 KR: Robinson 1976), zu den strahlenempfindlichsten Dipterenarten gezählt werden.

In Anbetracht der komplexen und vielseitig beeinflussbaren, biochemischen Vorgänge, die mit der Mutations-

entstehung verbunden sind, erscheinen strukturelle Bedingungen im Zellkern zunächst von untergeordneter Bedeutung. Andererseits müssen aber enge räumliche Beziehungen verschiedener Chromosomenbereiche zueinander als Vorbedingung für die Entstehung einer strukturellen Aberration angesehen werden (Bauer 1938). Damit erscheint auch eine "mechanistische" Deutung zur Erklärung der oben genannten Strahlensensitivitätsunterschiede zwischen verschiedenen Dipteren möglich, denn dominante Letalität und Chromosomenmutationen sind auf einen gemeinsamen Ursprung zurückzuführen (Hadorn 1961).

Dem entspricht, daß sich die Differenz in der Eisterberate zwischen D. melanogaster und P. cincta nach Bestrahlung von Spermien in den chromosomalen Mutationsraten widerspiegelt. Damit verbunden ist bei der empfindlicheren P. cincta eine erhöhte intrachromosomale Kontaktwahrscheinlichkeit, die sich mit der Bevorzugung einer kleinen Inversionslänge am besten durch spiralig verkürzte Chromosomen im Pronukleus erklären läßt (Israelewski 1975), während sich bei D. melanogaster durch die Analyse von Chromosomenaberrationen kein auffälliges Ordnungsprinzip nachweisen läßt (Bauer 1939). Die Parallelität zwischen unterschiedlichen chromosomalen Organisationstypen und unterschiedlichen Mutationsraten erhärtet die Hypothese, daß die höhere Strahlensensitivität von P. cincta hauptsächlich auf eine Erhöhung der Sitezahl durch Struktureigentümlichkeiten der Chromosomen im Pronukleus zurückgeht.

Angesichts der auffälligen, strukturellen Verhältnisse scheinen andere Sensitivitätsfaktoren keine größere Bedeutung zu haben. Aus dem Vergleich des Volumens

der Spermienköpfe von D. melanogaster und P. cincta ergibt sich ein ähnlicher DNA-Gehalt bei beiden Dipteren (Bauer und Lerche 1943). Nach der cytophotometrischen DNS-Messung an Feulgen-gefärbten Metaphase- oder Interphasechromosomen beträgt der 2C DNS-Wert bei D. melanogaster 0,36 pg (Rasch et al. 1971) und bei P. cincta 0,34 pg (Sokoloff und Zacharias 1977).

Ein größerer Einfluß heterochromatischer Bereiche auf die Mutationsrate bei P. cincta erscheint nach C-Bandenfärbung von Mitosechromosomen unwahrscheinlich. Mit etwa 5 % Heterochromatinanteil pro Chromosomenarm liegt der Wert bei P. cincta deutlich unter dem bei D. melanogaster.

Bei beiden Arten wurden Spermien in Imagines bestrahlt. Aus dem zeitlichen Ablauf der Spermiogenese bei P. cincta kann mit großer Sicherheit abgeleitet werden, daß nur Spermatozoen zur Bestrahlung kamen. Dagegen ist dem methodischen Ansatz der Untersuchung bei D. melanogaster (Bauer 1939) zu entnehmen, daß sowohl bestrahlte Spermatozoen als auch späte Spermatiden zur Befruchtung gelangten. In späten Spermatiden erfolgt ebenso wie in Spermatozoen keine Reparatur strahleninduzierter Brüche (Sobels 1972). Sie unterscheiden sich aber von Spermatozoen durch einen etwas geringeren Sauerstoffgehalt, der im Luft-Stickstoff-Erhöpfungsfaktor (AER) mit 1,23 bei späten Spermatiden gegenüber 1,52 bei Spermatozoen zum Ausdruck kommt (Sankaranarayanan 1974). Allerdings kann dieser geringe Unterschied im Sauerstoffgehalt beider Keimzellstadien von D. melanogaster, der in späten Spermatiden eine niedrigere Bruchinduktionsrate hervorrufen sollte als in Spermatozoen, nur

zu einem kleineren Anteil an der geforderten Sensitivitätsdifferenz zwischen D. melanogaster und P. cincta beteiligt sein. Zudem erweist sich auch im Vergleich der dominanten Letalitätsraten nach Bestrahlung von reifen Spermien, P. cincta etwa um den Faktor 2 empfindlicher als D. melanogaster. Was den Sauerstoff-Stickstoffeffekt bei Spermatozoen von P. cincta anbelangt, so ist kein Unterschied zu Spermatozoen von D. melanogaster feststellbar: Die AER- und OER-Werte bei beiden Arten sind nahezu identisch.

Ein Vergleich der Wirkungsweisen von Reparaturmechanismen in den Zygoten beider Dipteren ist, bei Eukaryonten allgemein, nur indirekt möglich.

Hinsichtlich der Beteiligung der einzelnen Chromosomen am Gesamtbruchgeschehen bei P. cincta ergibt sich kein Unterschied zu D. melanogaster. Bei beiden wurde eine hochsignifikante Übereinstimmung des relativen Längenteils eines Chromosoms im Genom mit dem entsprechenden Anteil am Gesamtbruchgeschehen festgestellt. Die scheinbar höhere Bruchneigung in heterochromatischen Kinetochorbereichen der Riesenchromosomen reduziert sich auf ein normales Niveau beim Vergleich der Längenteile, die diese Bereiche in den Mitosechromosomen einnehmen.

Die intrachromosomal beobachteten, systematischen Schwankungen der Bruchhäufigkeiten entlang eines Chromosomenarms sollten nicht die Folge unterschiedlicher Repairaktivitäten sein. Falls dies der Fall wäre, ist es nicht einzusehen, warum jeder Chromosomenarm genau entsprechend seiner relativen Länge am Gesamtbruchgeschehen beteiligt ist und unabhängig von seiner absoluten Länge

ein artspezifisches Verteilungsbild der Bruchhäufigkeiten aufweist. Bei D. melanogaster steigt die Kurve in der Bruchhäufigkeits-Verteilung zum distalen Ende hin an (Bauer 1939). Bei Tradescantia virginica verläuft die Kurve spiegelbildlich zu der von D. melanogaster. Bei P. cincta ergibt sich ein Maximum im medianen und distalen Bereich. Bei menschlichen Leukozyten (Obe 1969; 1971) und bei Vicia faba (Rieger und Michaelis 1959) liegt das Maximum auf dem distalen Drittel.

Da die Lage der Bruchorte von Chromosomenmutationen bestimmt wurden, ist es wahrscheinlicher, daß die unterschiedlichen intrachromosomalen Bruchverteilungen bei P. cincta und D. melanogaster verschiedene inter- und intrachromosomale Organisationen reflektieren, die im Einzelfall jedes Chromosom relativ und in gleicher Weise betreffen.

Ein qualitativer oder quantitativer Unterschied in der Wirkungsweise von Repairmechanismen bei D. melanogaster und P. cincta kann auch nicht aus dem jeweiligen Vergleich der Chromosomenmutationsrate mit der Überlebensrate abgeleitet werden. Trotz der enormen Sensitivitätsdifferenz sind die Beziehungen zwischen der Überlebensrate und der chromosomalen Aberrationsrate bei beiden Arten nicht voneinander zu trennen. Selbst die weitergehende Aufgliederung in einzelne Aberrationshäufigkeitsklassen stellt sich bei P. cincta und D. melanogaster als ein und dieselbe Funktion der chromosomalen Aberrationsrate dar. Entsprechend steht die mit Abberationen verbundene Bruchhäufigkeit bei D. melanogaster und P. cincta in einem sehr ähnlichen Verhältnis zur dominanten Letalität.

Diese Befunde weisen eindeutig darauf hin, daß die Reparaturvorgänge in einem Site bei D. melanogaster und P. cineta im Mittel ein gleichermaßen fixiertes Verhältnis von balancierten Aberrationen zu letal wirkenden Aberrationen hervorrufen.

Die Sensitivitätsdifferenz zwischen Drosophila und Phryne kann demzufolge weder mit unterschiedlichen DNS-Mengen, Heterochromatinanteilen, Sauerstoffkonzentrationen, noch mit Repairaktivitäten erklärt werden. Ebenso kann nicht davon ausgegangen werden, daß in Phryne-Spermien, infolge einer größeren Bruchempfindlichkeit der Chromosomen, mehr Primärläsionen induziert werden als in Drosophila-Spermien. Die Trefferkonstante bei Phryne stimmt innerhalb des Fehlerbereichs mit der bei Drosophila (Wolff 1963) überein.

Im Sinne von Bauer und Lerche (1943) bleibt damit zur Erklärung der hohen chromosomalen Aberrationsrate bei Phryne nur die Annahme einer entsprechend großen Kontaktwahrscheinlichkeit der Chromosomen im Pronukleus bestehen.

Es ist nicht unwahrscheinlich, daß die hier abgeleitete Korrelation zwischen Chromosomenstruktur und Strahlensensitivität auch bei anderen Organismen eine besondere Rolle spielt. Zur Induktion von Enzymdefekt-Mutanten benötigen menschliche Zelllinien eine etwa 3 - 4fach höhere Strahlendosis als chinesische Hamsterzellen. Diese Sensitivitätsdifferenz kann jedoch in der Beziehung der Überlebensrate zur Mutationsrate nicht mehr nachgewiesen werden (Thacker und Cox 1975). Das entspricht vollkommen dem oben beschriebenen Ergebnis bei D. mela-

nogaster und P. cincta. Auf eine Abhängigkeit der Translokationsrate von der chromosomalen Organisation bei menschlichen Zellen weisen Holmberg (1976), sowie Beek und Obe (1977) hin und Ahnström und Natarajan (1971) beim Weizen. Dewey et al. (1972) finden eine direkte Korrelation zwischen dem Abstand der Chromosomenfibrillen und der Aberrationsrate bei chinesischen Hamsterzellen.

Nach den vorliegenden Ergebnissen geht eine Erhöhung der Kontaktwahrscheinlichkeiten im Zellkern mit dem Auftreten von Spiralen in den Chromosomen einher. Damit ändern sich die relativen Entstehungsmöglichkeiten für intra- und interchromosomale Aberrationstypen zugunsten kleinerer Inversionen (Israelewski 1975). Beim Übertragen dieser Verhältnisse auf andere Testsysteme, bei denen die Erfassung von kleinen Inversionen nicht möglich ist, sollte der alleinige Vergleich unterschiedlicher Translokationshäufigkeiten zu Schwierigkeiten bei der Bestimmung der Gesamtmutabilität führen. Ein direkter Vergleich der Translokationsraten bei verschiedenen Organismen würde dann, ohne Kenntnis der Entstehungswahrscheinlichkeiten für Inversionen, keine Rückschlüsse auf die zugrundeliegende Gesamtsensitivität erlauben.

2. Sensitivitätsunterschied zwischen dem bs- und as-Stamm von Phryne cincta nach Bestrahlung

Replikation, Crossing-over und Repair haben in der Genetik zellulärer Organismen eine zentrale Bedeutung. Die damit verbundenen Mechanismen scheinen nach Untersuchungen an Bakterien und Pilzen über gemeinsame, enzymatische Reaktionswege voneinander abhängig zu sein.

Dies trifft auch für Drosophila zu (Watson 1968; 1971; Smith 1976). Eine Beeinträchtigung im Replikations- oder Crossing-over Mechanismus geht allgemein mit einer Erhöhung der Mutationsrate einher (Hanawalt und Setlow 1975).

Dagegen ergab die Analyse des bs- und as-Stammes von Phryne cincta eine umgekehrte Relation:

Mit der etwa 10fach höheren Rekombinationsfrequenz beim as-Stamm ist eine Sensitivitätssteigerung um den Faktor 1,33 nach Bestrahlung von Spermatozoen verbunden. Diese Differenz zwischen den beiden Stämmen wird in der chromosomalen Mutationsrate wie in der Eisterberate gleichermaßen sichtbar.

Die im Vergleich mit dem bs-Stamm erhöhte Mutationsbereitschaft der as-Tiere kann nicht auf die im X_a -Chromosom zusätzlich vorhandenen zwei Heterochromatinblöcke zurückgeführt werden. Da jedes Chromosom entsprechend seiner Länge in der Mitose am Gesamtbruchgeschehen beteiligt ist, wäre nur für die X-tragenden Spermien eine etwa 10%ige Differenz in der Mutationsrate beider Stämme zu erwarten, während die Y-tragenden Spermien bei bs und as in ihrem DNS-Gehalt vollständig übereinstimmen. Dennoch weisen auch die männlichen Nachkommen aus bestrahlten as-Spermien gegenüber bs-Spermien eine um den Faktor 1,3 höhere chromosomale Mutationsrate auf.

Weiterhin ergibt sich kein Anhaltspunkt dafür, daß unterschiedliche Repairmechanismen oder -kapazitäten für die höhere Strahlensensitivität im as-Stamm verantwortlich sind. Bei Phryne werden, wie bei Drosophila, die in Spermien induzierten Brüche in der DNS erst in der Zygote durch mütterliche Repairsysteme zusammengefügt

(Israelewski 1975). Die Höhe der Eisterberate bleibt jedoch vollkommen unbeeinflusst vom Genotyp des zur Kreuzung benutzten Weibchens und wird allein vom Genotyp des bestrahlten Männchens bestimmt.

In Parallelität mit dem Vergleich Drosophila - Phryne können die in beiden Stämmen identischen Beziehungen zwischen der Überlebensrate und der chromosomalen Mutationsrate nur so gedeutet werden, daß die Reparaturvorgänge in jedem Site im Mittel ein fixiertes Verhältnis von balancierten zu unbalancierten Aberrationen hervorrufen.

Bis zu diesem Punkt bleibt, wiederum in Analogie mit der Situation bei Drosophila und dem bs-Stamm von Phryne, nur die Annahme einer bei as noch weiter erhöhten Kontaktmöglichkeit der Chromosomen im Pronukleus bestehen.

Tatsächlich kann aus dem Vergleich des Bruchabstands von Inversionen bei as und bs auf eine unterschiedliche, chromosomale Organisation in den Pronuklei beider Stämme geschlossen werden.

Es kann davon ausgegangen werden, daß die hohe intra-chromosomale Kontaktwahrscheinlichkeit und die bevorzugte Entstehung von kleinen Inversionen bei as und bs auf Spiralstrukturen in den Pronukleuschromosomen basieren. Im Vergleich der beiden Inversionslängenverteilungen ergab sich bei as eine Verschiebung zu niedrigeren Werten. Der Verkleinerung des Bruchabstandes von Inversionen sollte eine Verkleinerung des Spiralenwindungsumfangs in den as-Chromosomen zugrundeliegen.

Formal gesehen entspricht einer Windung eine Kontakteinheit im Kern. Rechnerisch ergeben sich mit dem aus den kleinen Inversionen abgeleiteten Windungsumfang von

1,7 (Karteneinheiten), bei as 49 "Kontakteinheiten" und bei bs mit dem Windungsumfang 2,1 (Karteneinheiten) 36 "Kontakteinheiten", wobei die Längenverhältnisse der beiden X-Chromosomentypen in der Mitose berücksichtigt wurden.

Trotz dieser formalen Betrachtungsweise unterscheidet sich der as- vom bs-Stamm in der Anzahl der Windungen in den Pronukleuschromosomen etwa um den gleichen Faktor (1,36), der auch den beobachteten Sensitivitätsunterschied (Faktor 1,33) charakterisiert.

Gleichzeitig wird mit der Verkleinerung des Windungsumfangs und mit der damit verbundenen Erhöhung der Windungszahl (Kontakteinheiten) pro Chromosom bei as eine Änderung des Verhältnisses von intra- zu interchromosomalen Aberrationstypen zugunsten der Translokationen erwartet: Bei as stehen gegenüber bs relativ mehr Läsionen für interchromosomale Berührungen zur Verfügung, so daß der Anteil intrachromosomaler Berührungspunkte relativ kleiner wird. Genau dies wurde beobachtet. Das Verhältnis von Inversionen : Translokationen ändert sich von 2 : 1 im bs-Stamm zu 1 : 1 im as-Stamm, wobei die Änderung bei as gleichermaßen zugunsten der Translokation und ^{zu}ungunsten der Inversionen erfolgte.

Alle diese Beobachtungen weisen darauf hin, daß der bs- und as-Stamm von P. cincta durch unterschiedlich spiralisierte Chromosomen im Pronukleus charakterisiert sind. Darüber hinaus scheinen die Spiralen bei P. cincta fast vollständig das Mutationsgeschehen zu bestimmen. Damit reiht sich der as-Stamm zwanglos in die Sensitivitätsrangfolge Drosophila melanogaster - Phryne cincta (bs) - Phryne cincta (as) ein, womit in der gleichen

Folge auffällige Änderungen in der Chromosomenorganisation verbunden sind; von Spiralen mit großen Durchmesser bei Chromosomen im Pronukleus von Drosophila (vgl. Kaufmann 1946) zu Spiralen mit kleinem Durchmesser bei Phryne cincta (as).

Allein diese Änderungen in der Chromosomenstruktur könnten die geforderte Erhöhung der Site-Zahl in der Reihenfolge Drosophila - Phryne (bs) - Phryne (as) herbeiführen.

Mit der beim bs-Stamm von Phryne nachgewiesenen Polfeldorientierung der Chromosomen in den Spermien, die auch noch im Pronukleusstadium, durch eine Bevorzugung kleiner Kinetochor-Translokationsbruch-Abstandsdifferenzen zu erfassen ist, wäre weder die hohe intrachromosomale Kontaktwahrscheinlichkeit, noch die auffällig hohe Zahl kleiner Inversionen erklärbar.

Bisher wurde eine basale Position der Kinetochorbereiche und U-förmige Lage der Chromosomen in Spermatozoen nur bei verschiedenen Schwanzlurcharten (Amphibia, Urodela) beschrieben (MacGregor und Walker 1973; Schmid und Krone 1975, 1976; Dressler und Schmid 1976). Die gleiche Polfeldorientierung der Chromosomen in Spermatozoen von Phryne cincta (bs) zeigt, daß diese chromosomale Anordnungsweise nicht nur bei Amphibien aufzufinden ist.

Eine weitere Gemeinsamkeit zwischen Phryne cincta (bs) und den Amphibien besteht in der Beobachtung eines heterochromatischen Bereichs an der Spitze des Spermiums. Dieser Bereich kann bei Phryne (bs) nur ein Kinetochorabschnitt sein. In den Chromosomenarmen treten keine Heterochromatinblöcke auf. Möglicherweise kann diesem

Kinetochorbereich die gleiche Funktion zugeschrieben werden wie bei den Amphibienarten oder bei Gallus domesticus. Dort determiniert ein heterochromatischer Bereich in einem Chromosom den Ort auf der Kernmembran in den Spermatiden, der während der Spermiogonogenese zur Spitze des Spermiums ausgezogen wird. Gleichzeitig scheint derselbe heterochromatische Bereich auch die Bildung des Akrosoms zu veranlassen, denn dieses "akrosomale Chromocentrum" (Schmid und Krone 1975) folgt der Verlängerung des Spermienkopfes und setzt sich somit von den anderen Kinetochorbereichen ab.

Das "Auswandern" eines Chromosoms aus dem basalen Bereich zur Spitze des Spermiums sollte eine gewisse Störung in der polaren Anordnungsweise der anderen Chromosomen hervorrufen. Es wäre zu prüfen, ob die bei *as* gegenüber *bs* beobachtete Veränderung in der Lagebeziehung der Autosomen durch eine derartige Störung erklärt werden kann. Bisher deuten die Ergebnisse darauf hin, daß bei Phryne die Kinetochorbereiche der Geschlechtschromosomen (X oder Y) mit den akrosomalen Chromozentren identisch sind. In diesem Fall sollte die Positionsänderung des etwa 2fach längeren X_a -Chromosoms gegenüber dem kurzen X_b -Chromosom während der Spermiogonogenese zu einer größeren Störung in der Lagebeziehung der Autosomen führen. Dementsprechend ist die beobachtete Abweichung von der polaren Anordnungsweise der Autosomen im *as*-Stamm nur in den X_a -tragenden Spermien nachweisbar, während in Y-tragenden *as*-Spermien wiederum eine Polfeldorientierung der Autosomen wahrscheinlich ist. Das kleine Y-Chromosom scheint demnach, ebenso wie das kleine X_b -Chromosom, keinen größeren Einfluß auf die Lagebeziehung der Autosomen zu haben.

Ogleich nur wenige Y/Autosomen-Translokationen beobachtet wurden, ist eine Tendenz für eine bevorzugte Lage des Translokationspunktes in den distalen Bereichen der Autosomenarme nicht zu übersehen. Dies unterstützt weiterhin die Annahme, daß das Y-Chromosom mit dem akrosomalen Chromozentrum im Spermium identisch ist. Eine entsprechende Analyse der X/Autosomen-Translokationen würde, wegen der sehr unterschiedlichen, relativen Länge des X-Chromosoms in der Mitose und in Speicheldrüsenzellen, keinen Rückschluß auf die relative Lage des X-Chromosoms im Spermium zulassen.

3. Evolutive Gesichtspunkte zur Korrelation zwischen Chromosomenstruktur und Strahlensensitivität

Mit einer Korrelation zwischen Chromosomenstruktur und Strahlensensitivität wäre eine reelle Basis geschaffen, eine Erhöhung in der chromosomalen Mutationsrate mit einer Erhöhung der Site-Anzahl zu beschreiben. Es erhebt sich jedoch die Frage, welche Bedingungen zu einer Änderung in der Chromosomenstruktur führen. Es ist davon auszugehen, daß jede Änderung in einem Organismus der Selektion unterliegt und nur dann erhalten bleibt, wenn sie einen gewissen Vorteil für die betreffende Population hat. Insbesondere im Hinblick auf die artenarme Familie der Phryneiden ist es nicht einzu- sehen, mit welchem Vorteil eine hohe chromosomale Mutationsbereitschaft verbunden sein sollte. Berücksichtigt man ferner, daß nur ein geringer Bruchteil aller neu entstehenden Chromosomenmutationen der Evolution zur Verfügung stehen, dann scheint eine Variation der Strahlensensitivität um den Faktor 3 im Bereich der Dipteren

evolutiv bedeutungslos zu sein. In diesem Sinn kann es auch als nicht wahrscheinlich gelten, daß die Sensitivität nur deswegen geändert wird, damit z. B. bei Phryne mehr kleine Inversionen in der Evolution zur Verfügung stehen. Der Vergleich der beiden Phryne-Arten cincta und fenestralis zeigt, daß kleine Inversionen relativ häufig Bestandteile des chromosomalen Polymorphismus bei Phryne sind. Es ist jedoch nicht erforderlich, daraus eine Notwendigkeit zur bevorzugten Entstehung von kleinen Inversionen abzuleiten. Die Beibehaltung einer großen Entstehungswahrscheinlichkeit für Inversionen wäre dann nicht mehr notwendig, wenn die Aufnahmekapazität im Rahmen des chromosomalen Polymorphismus einer Art erschöpft ist.

Eine mögliche Erklärung der unterschiedlichen strukturellen Gegebenheiten bei verschiedenen strahlensensitiven Dipteren könnte aus einer Korrelation zwischen der Rekombinationsrate und der Mutationsrate abgeleitet werden.

Der Vergleich der beiden Phryne-Stämme bs und as ergab eindeutig, daß die niedrigere Rekombinationsrate bei bs nicht in Analogie mit Untersuchungen an Meiosedefekt-Mutanten bei Mikroorganismen oder bei Drosophila mit einer Beeinträchtigung der Repairmechanismen einhergeht. Vielmehr weisen beide Stämme die gleiche Repairkapazität auf. Gleichzeitig muß die erhöhte Mutationsrate bei as und die damit verbundenen, strukturellen Änderungen in den Pronukleuschromosomen, wie die erhöhte Rekombinationsrate, allein auf Genorte im X_a -Chromosom zurückgeführt werden, genauer auf 2 gegenüber dem X_b -Chromosom

zusätzlich vorhandene, konstitutive Heterochromatinblöcke (vgl. Wolf 1963).

Es kann als gesichert gelten, daß eine in jedem Stamm unterschiedliche, genetische Determination des Windungsumfangs in G_1 -Chromosomen erfolgt. Der Windungsumfang wird offenbar nicht direkt festgelegt, sondern nur relativ. D. h., daß jedes Riesenchromosom nur dann stamm-spezifisch einen charakteristischen Spirалendurchmesser aufweist, wenn der Windungsumfang nicht mit absoluten, sondern mit relativen Längeneinheiten (aus der Chromosomenkarte) verglichen wird. Das heißt auch, daß die Gesamtanzahl der Windungen in den Chromosomen, unabhängig vom Polytäniegrad und vom Streckungszustand der Chromosomen, konstant bleibt.

Nur so ist die erstaunlich genaue Übereinstimmung des relativen Windungsumfangs in as-Riesenchromosomen mit dem Windungsumfang, der aus den Inversionslängen für einsträngige Pronukleus-Chromosomen abgeleitet wurde, zu erklären. Ein größerer, relativer Windungsumfang ergibt sich in bs-Riesenchromosomen, der wiederum mit dem abgeleiteten Windungsumfang in den Pronukleus-Chromosomen übereinstimmt.

Dieser Befund kann als erster Hinweis darauf gewertet werden, daß auch Interphase-Chromosomen allgemein eine genetisch festgelegte, makromolekulare Feinstruktur besitzen.

In den geschlechtschromosomal heterozygoten Weibchen ($X_a X_b$) wird in den Autosomen genau der mittlere Windungsumfang beider Stämme gemessen. Dies weist auf eine intermediäre Merkmalsausbildung und auf kleine Anzahl (möglicherweise ein Allelpaar) strukturbestimmender Gene auf

dem X_a , bzw. auf dem X_b -Chromosom hin.

Somit kann nicht mehr das Modell von Lowman (1955) aufrechterhalten werden, wonach die Spiralstrukturen in Speicheldrüsenchromosomen von Drosophila melanogaster durch Torsionskräfte im Verlauf der Polytänisierung entstehen sollen. Die identischen Spiralenverhältnisse in einsträngigen Pronukleus-Chromosomen sowie in Riesenchromosomen können nur bedeuten, daß ein vorbestimmter Windungsumfang ein Charakteristikum für jede einzelne Fibrille im Polytänchromosom ist.

In jedem Fall sollte die DNS der Autosomen nur passiv an der Ausbildung von Spiralen beteiligt sein. Bei Phryne weisen die Autosomen in beiden Stämmen hinsichtlich der DNS keine Unterschiede auf. Die beobachtete Differenz zwischen a_s und b_s im Windungsumfang der Chromosomen ist dann in einer qualitativen oder quantitativen Veränderung strukturbestimmender Proteine zu suchen.

Aus den Strukturverhältnissen in den Riesenchromosomen ist abzuleiten, daß für eine stetige Krümmung entlang jeder Fibrille ein im Mittel konstanter Winkel zwischen zwei aufeinanderfolgenden Banden erreicht werden muß. Somit sollten in den Interbanden die Proteinelemente gesucht werden, die die DNS-Fibrille zu einer Spirale formen. Bei Drosophila entsprechen der Länge und DNS-Menge einer mittleren Interbandfibrille maximal 2000 Basenpaare, bei einem DNS-Packungsverhältnis von maximal 5 : 1 (Beermann 1972). Der Durchmesser von 150 Å ergibt sich aus einer überspiralisierten DNS-Helix, die mit Histonen assoziiert ist (Ris und Kubai 1970). Auch bei einer Reihe von anderen Organismen ist ein ähnliches, primäres Packungsverhältnis der DNS aufzufinden. Bei

Eukaryonten erfolgt die primäre Packung der DNS in identischen Struktureinheiten, den Nukleosomen (Oudet et al. 1975), die durch eine enge Assoziation der DNS mit jeweils 2 der Histone H2a, H2b, H3 und H4 gebildet werden (Varshavsky 1976). Trotz der Stabilität in der Struktur der Nukleosomen ist ihre Anordnungsweise auf den Chromosomen verschiedener Organismen sehr variabel. Sie können artspezifisch serienweise hintereinander geschaltet sein und dabei einen größeren oder kleineren Abstand zueinander aufweisen oder in unregelmäßiger Weise verteilt sein (Lohr et al. 1976).

Eine derartige, spezifische Anordnungsweise der Nukleosomen wäre zu fordern, falls sie an der Ausbildung der beobachteten, stammspezifischen Spiralen in den Riesenchromosomen von Phryne cincta beteiligt sind. Es wäre nur noch eine räumliche Beziehung der einzelnen Nukleosomen zueinander notwendig, um eine kontinuierliche Krümmung der DNS-Fibrille in einer Interbande zu erreichen.

Tatsächlich ist in elektronenmikroskopischen Aufnahmen im Chromatin von Ehrlich Ascites Tumorzellen eine Basisspirale erkennbar, bei der sich jede Windung aus mehreren Nukleosomen zusammensetzt (Bakayev 1975). Prinzipiell wäre es somit möglich, wenn auch nicht nachgewiesen, daß die Nukleosomenspirale selbst die Orientierungsbasis für eine weitere Spirale darstellt. Bei einem hierarchischen Spiralenaufbau, wie er in den Meiosechromosomen von Pflanzen deutlich sichtbar wird (Geitler 1938; Linnert 1955; Oelkers und Eberle 1956),

wäre jede Spirale durch die Basisspirale determiniert (vgl. Crick und Klug 1975). Eine Änderung in der Basis-spirale würde eine Änderung in der Großspirale hervor-rufen.

In diesem Fall könnte die bei Phryne beobachtete stammspezifische Differenz im Spiralendurchmesser der Riesenchromosomen auf eine geänderte Anordnungsweise der Nukleosomen in den Interbanden zurückgeführt werden.

Eine stammspezifische Variation des Nukleosomenab-standes könnte weiterhin die Ursache für die unterschied-lichen Rekombinationsraten in beiden Stämmen von P. cincta sein. Dies würde bedeuten, daß der Cross Over-Vorgang vom Organisationsprinzip des Chromatins abhängig ist und der Beobachtung entsprechen, daß trotz der hohen Rekombinationsrate im as-Stamm keine Unterschiede im Repair-verhalten gegenüber dem bs-Stamm vorhanden sind. Es ist somit wahrscheinlich, daß bei beiden Stämmen unter-schiedliche Vorbedingungen für den Austausch von Chro-mosomenabschnitten in der Meiose zu unterschiedlichen Rekombinationsraten führen.

Eine primäre Bedingung ist die Paarung der homologen Chromosomen und eine weitere die Induktion von Einzel-strangbrüchen in der DNS durch eine Endonuklease (vgl. Whitehouse 1963; Hotta und Stern 1971). Eine Erhöhung in der Anzahl der Einzelstrangbrüche durch Kältebehand-lung führt bei Coprinus lagopus zu einer Erhöhung der Crossing Over-Rate (Lu und Chiu 1976). Der gleiche Ef-fekt sollte aber auch aus einer geänderten Anordnungs-weise der Nukleosomen resultieren, denn im Gegensatz zu den Nukleosomen selbst sind die Spacerregionen bevor-

zugte Angriffsbereiche für Nukleasen (vgl. Kornberg 1974; Noll 1974). Ein größerer Nukleosomenabstand legt dann einen längeren endonukleasesensitiven DNS-Abschnitt frei, so daß in einer gegebenen Zeiteinheit relativ mehr Einzelstrangbrüche entstehen könnten.

Demnach wäre im as-Stamm von P. cincta ein größerer Abstand zwischen den Nukleosomen zu erwarten als im bs-Stamm. Falls darüber hinaus die Anordnungsweise der Nukleosomen im Chromatin mit der Spiralstruktur der Chromosomen und die Chromosomenstruktur wiederum mit der Strahlensensitivität in Beziehung steht, dann sollte sich der Nukleosomenabstand von Drosophila zu Phryne (bs) zu Phryne (as) in ähnlicher Weise vergrößern, wie sich die Strahlensensitivität erhöht.

4. Embryonale Sterberate nach Behandlung reifer Spermien von Phryne cincta mit Trenimon und mit Trenimon in Kombination mit Natriumfluorid

Nach Behandlung von P-Männchen mit dem trifunktionellen Alkylans Trenimon wird beim as-Stamm eine höhere Eisterberate beobachtet als beim bs-Stamm. Bei 10^{-5} M Trenimon ergibt die Behandlung 80 % letale Embryonen bei as und 65 % bei bs. Mit der gleichen Konzentration Trenimon werden bei Drosophila melanogaster nur 30 % dominante Letalfaktoren induziert (Vogel 1973). Ähnliche Unterschiede in den Eisterberaten bei Drosophila, Phryne (bs) und Phryne (as) wurden nach Röntgenbestrahlung beobachtet (vgl. 1. und 2.).

Nach mutagener Behandlung verschiedener Keimzellstadien von Cochliomyia hominivorax (Diptera, Calliphoridae)

finden Lachance und Crystal (1965) im Fall einer Änderung der Sensitivität gegenüber Röntgenstrahlen, auch eine ähnliche Änderung der Sensitivität gegenüber dem Chemomutagen Tretamin. Zwischen den Ergebnissen von Lachance und Crystal (1965) und den Befunden dieser Arbeit besteht demnach gute Übereinstimmung.

Aufgrund der cytogenetischen Untersuchung früher Furchungsteilungen bei Cochliomyia sind unbalancierte Chromosomenmutationen die Ursache für die dominante Letalität (Lachance und Riemann 1964). Ebenso führen bei Drosophila (Borstel und Rekemeyer 1959; Traut 1968) und bei Säugetieren (Basler et al. 1976; Brewen et al. 1975; Matter und Jäger 1975) unbalancierte Chromosomenmutationen zu letalen Schädigungen embryonaler Zellen.

Das Absterben der Embryonen nach Behandlung von Spermien mit Trenimon geht auch bei Phryne cincta sehr wahrscheinlich auf induzierte Chromosomenmutationen zurück. Ein unspezifischer, toxischer Einfluß des Mutagens auf Spermatozoen kann ausgeschlossen werden. Wenn dies der Fall wäre, sollte die Trenimonbehandlung bei beiden Stämmen identische Wirkungen zeigen.

Der Unterschied in den Eisterberaten beider Stämme bleibt auch dann erhalten, wenn Spermien mit der Kombination von Trenimon und Natriumfluorid behandelt werden. Die Trenimonkonzentration muß bei beiden Stämmen etwa um eine 10er-Potenz erhöht werden, um den antimutagenen Effekt des Natriumfluorids auszugleichen. Die daraus resultierende Parallelverschiebung der durch Trenimon allein induzierten Dosiseffektbeziehung für dominant

letale Mutationen ist am einfachsten dadurch zu erklären, daß eine bestimmte Fluorid-Konzentration eine konstante Anzahl von Trenimon-Molekülen inaktivieren kann. Auf eine mögliche konzentrationsabhängige, antimutagene Wirkung des Natriumfluorids auf Trenimon-induzierte Chromosomenaberrationen bei Drosophila weisen auch Büchi und Bürki (1975) hin.

Die vorliegenden Ergebnisse und die Befunde von Büchi und Bürki (1975), machen andere Erklärungsmöglichkeiten für die Schutzwirkung des Natriumfluorids, z. B. eine Aktivierung der Repairmechanismen in der Zygote, unwahrscheinlich. Die Induktion von Läsionen erfolgt in Spermien, die Reparatur aber erst in den Zygoten. Bei Drosophila beeinflußt Natriumfluorid nicht die Repairkapazität im Pronukleus mit geschädigten Chromosomen (Büchi und Bürki 1975; Mendelson 1976). Phryne cincta dürfte sich in dieser Hinsicht nicht von Drosophila unterscheiden.

Eine einfache chemische Reaktion des Natriumfluorids mit Trenimon könnte zu einem inaktiven Produkt führen und so die antimutagene Wirkung bedingen. Aufgrund chemischer Analysen (vgl. Vogel 1973) ist dies nicht sehr wahrscheinlich. Letztlich bleiben nur noch die Möglichkeiten, daß Fluoridionen einen schützenden Mantel um die Chromosomen im Spermium bilden oder eine Reaktion des Trenimons mit chromosomalen Proteinen katalysieren. Ein einfacher Schutz der DNS vor Doppelstrangalkylierungen würde dem beobachteten, parallelen Verlauf der Dosiseffektbeziehungen für dominant letale Mutationen nach Trenimon- bzw. Trenimon plus Natriumfluorid-Behand-

lung besser entsprechen als eine Natriumfluorid-katalysierte, chemische Reaktion des Trenimons mit chromosomalen Proteinen.

Die konstante Erniedrigung der Primärläsionenanzahl durch Natriumfluorid wäre jedoch nur dann gegeben, wenn Fluoridionen eine besondere Affinität zu eng umgrenzten DNS-Bereichen im Chromatin hätten, die auch bevorzugt von Alkylierungen betroffen werden.

Eine differentielle, primäre Packung der DNS durch Histone, die alternierend spiralisierte und entspiralisierte DNS-Abschnitte bedingen, ist bei verschiedenen Organismen nachgewiesen worden und scheint ein Charakteristikum der Eukaryonten zu sein. Die spiralisierten DNS-Bereiche entsprechen den elektronenmikroskopisch nachweisbaren Nukleosomen, die gegenüber Nukleaseeinwirkung wesentlich resistenter sind als die sie verbindenden Spacer-Bereiche mit gestreckter DNS (Varshavsky 1976). Es ist zu erwarten, daß Spacer-Regionen nicht nur leichter von Enzymen angegriffen werden können, sondern auch leichter alkyliert werden als die Nukleosomen. So würde sich eine bevorzugte Lage und Anhäufung induzierter Läsionen in den Spacer-Bereichen ergeben. Entsprechend sollten monofunktionelle Alkylantien häufiger beide Stränge der DNS an homologen Stellen alkylieren können, als bei zufälliger Verteilung der Läsionen über die gesamte DNS zu erwarten wäre. Tatsächlich treten Isochromatidbrüche, die vermutlich auf isolokale Einzelstrangalkylierungen zurückgehen (Brewen et al. 1975), nach Behandlung von Spermien der Maus mit Methylmethan-Sulfonat (Brewen et al. 1975) und von Hamsterzellen mit Adriamycin (Kusyk und Hsu 1976) häufiger als erwartet auf.

Die antimutagene Wirkung des Natriumfluorids würde danach nur in Verbindung mit der strukturellen Organisation des Chromosoms zustandekommen (Israelewski und Obe 1977) und auf instabilen Bindungskräften zwischen Fluoridionen und Spacer-Bereichen des Chromatins beruhen.

Bei Drosophila ist der antimutagene Effekt des Natriumfluorids nicht mehr nachweisbar, wenn die Behandlung von Spermien mit Natriumfluorid 6 Stunden vor der Trenimonzugabe erfolgte (Vogel 1973). Demgegenüber erniedrigt eine 15stündige Vorbehandlung mit Natriumfluorid die chromosomale Aberrationsrate bei menschlichen Zellen (Slacik-Erben und Obe 1976). Der Widerspruch zwischen den Ergebnissen aus der Vorbehandlung mit Natriumfluorid bei Drosophila oder menschlichen Zellen schließt jedoch eine Wechselwirkung von Natriumfluorid mit dem Chromatin nicht aus. Diese Deutungsmöglichkeit würde eine NaF-DNS Bindung voraussetzen, die von physiologischen Bedingungen in der Zelle beeinflusst werden kann. Insofern sollten in metabol aktiven menschlichen Zellen und in inaktiven Spermien eine unterschiedliche Beeinflussung der vermuteten Wechselwirkung von Natriumfluorid mit dem Chromatin erfolgen.

Die antimutagene Wirkung des Natriumfluorids stellt sich danach folgendermaßen dar: Fluoridionen schützen die sensitiven Spacer-DNS-Abschnitte vor Crosslink-Reaktionen bei Einwirkung von polyfunktionellen Alkylantien. Es wäre damit zu erwarten, daß bei allen Eukaryonten der Fluorideffekt in einer Parallelverschiebung der Dosiseffektbeziehung für chromosomale Aberrationen sichtbar wird.

5. Korrelation zwischen chromosomaler Mutationsrate und Überlebensrate

Die Frage nach dem Ursprung der Chromosomenmutationen betrifft die Auslösung von Primärläsionen, die räumlichen Beziehungen und den Aufbau der Chromosomen, sowie den zeitlichen Ablauf und das Ergebnis von Reparaturvorgängen an den Chromosomen. Was den Bau der Chromosomen anbelangt, so wurde die Diskussion um die Anzahl der DNS - Helices in einer Chromatide zugunsten des Einstrang - Modells entschieden (Laird 1971; Swift 1973; Van de Vlierd 1975). Danach ist nach Bestrahlung von postmeiotischen Keimzellstadien das Chromosom die Mutationseinheit, wenn die Reparatur von Läsionen in einem Site vor der Replikation erfolgt. Dementsprechend werden nach Bestrahlung von Spermien fast ausschließlich Chromosomenmutationen induziert. Die seltene Beobachtung von Chromatidaberrationen nach Bestrahlung von Spermien steht nicht im Widerspruch zu der Annahme, daß jedes Chromosom im Spermium eine einzige DNS - Helix enthält. Läsionen in einsträngigen Chromosomen müßten bis nach der Replikation unverändert bestehen bleiben und erst dann, in der Folge eines postreplikativen Reparaturvorgangs, an der Entstehung von Chromatidaberrationen beteiligt sein (Bauer 1942; Slizynska 1963; Novitski 1963; Leigh und Sobels 1970; Maddern und Leigh 1976).

Aus dem Tatbestand, daß nach Bestrahlung von Spermien Mosaiktiere nur sehr selten auftreten und aus den Befunden von Maddern und Leigh (1976), die bei Drosophila einen großen Anteil (größer als 20%) von

Chromatidaberrationen neben Chromosomenaberrationen nachweisen, ergibt sich scheinbar ein Widerspruch. Aus diesen Ergebnissen muß geschlossen werden, daß entweder Chromatidaberrationen in der Regel zum Absterben des Embryos oder zur Elimination eines der ersten beiden Teilungskerne führen, während der zweite, vitale Teilungskern die weitere Embryonalentwicklung ermöglicht (Leigh und Sobels 1970).

Ob nun Chromatidaberrationen das Absterben des Eies bedingen oder die Elimination eines Teilungskernes, in beiden Fällen scheinen Chromatidaberrationen in den folgenden Zellgenerationen fast immer letale Wirkungen zu haben. Dementsprechend ist bei Drosophila die Entstehung von Chromosomenfragmenten zum großen Teil auf Reparaturvorgänge an replizierten Chromosomen zurückzuführen.

Möglicherweise bewirken Chromatidaberrationen allgemein häufig letale Schäden bereits in der folgenden Zellgeneration. Nach Behandlung von somatischen und von meiotischen Zellen der Maus mit dem trifunktionellen Alkylans Trenimon werden ausschließlich Chromatidaberrationen induziert, die offenbar nicht als Chromosomenaberrationen in der nächsten Zellgeneration erhalten bleiben (Datta et al. 1970; Schleiermacher 1970). Diese Befunde erklären auch die Wirkung von Trenimon auf Spermatozoen von Phryne, wie die Wirkung von verschiedenen Alkylantien auf Spermien von Drosophila (Slizynska 1973). Bei beiden Dipteren werden nur wenige, sichtbare Aberrationen in den überlebenden Nachkommen gefunden (etwa 10%, zum größten Teil Mosaik), obwohl die Trenimonbehandlung bei Phryne in 80 - 95 % aller Zygoten zu letalen Schäden an replizierten Chromosomen führt (vgl. 4.). Demgegenüber werden nach Röntgenbestrahlung von Phryne - Spermien in etwa 70 % aller überlebenden Zygoten chromosomale Aberrationen induziert,

während 80 - 95 % der sich entwickelnden Eier absterben.

Die sehr unterschiedlichen, chromosomalen Aberrationsraten nach Trenimonbehandlung, bzw. nach Bestrahlung von Spermien und der Befund, daß die Reparatur von strahlen-induzierten Läsionen sowohl vor, als auch nach der Replikation erfolgt, sowie die hohe Beteiligung chromatidaler Austauschprozesse an der Entstehung von Chromosomenfragmenten (Maddern und Leigh 1976), weisen auf recht unterschiedliche Folgen von Reparaturvorgängen an einsträngigen, bzw. an replizierten Chromosomen hin. Es könnte vermutet werden, daß bei einsträngigen Chromosomen die zufällige Verbindung von 4 Bruchenden in einem Site im Mittel zu einer Restitution, einer balancierten Chromosomenmutation und einer unbalancierten Chromosomenmutation führt, während in der Folge von postreplikativen Reparaturvorgängen hauptsächlich unbalancierte Chromosomenmutationen entstehen.

Hinsichtlich der Repairkapazitäten dürfte sich Phryne nicht von Drosophila unterscheiden. Trotz der Sensitivitätsdifferenz nach Bestrahlung (oder nach Trenimon) weisen beide Dipteren identische Beziehungen zwischen chromosomaler Mutationsrate und Überlebensrate auf. Desgleichen ergeben sich in dieser Beziehung keine Abweichungen zwischen dem as- und bs - Stamm von Phryne.

Als Ursache für die zygotische Sterblichkeit kommen in erster Linie unbalancierte Chromosomenmutationen in Betracht, die nach den oben genannten Befunden in einer bestimmten Beziehung zu den balancierten Chromosomenmutationen stehen sollten. Bei Phryne kann davon ausgegangen werden, daß, aufgrund der Analyse an Riesenchromosomen, das fast vollständige Mutationsspektrum der balancierten Chromosomenmutationen erfaßt wurde. Die Beziehung zwischen

chromosomaler Mutationsrate und Überlebensrate sollte demnach eine nähere Deutung der zugrundeliegenden Vorgänge gestatten.

Der Anteil der dominant-letalen Mutationen kann aus dem der balancierten Chromosomenmutationen berechnet werden, wenn man annimmt, daß im Mittel neben jeder balancierten Chromosomenmutation (M) eine Restitution (R) sowie vier unbalancierte Chromosomenmutationen (LK) entstanden sind ($M : R : LK = 1 : 1 : 4$). Die gute Übereinstimmung der berechneten mit den beobachteten Sterblichkeitsraten kann nicht auf einem Zufall beruhen. Gestützt wird die Annahme, daß die Reparaturvorgänge in jedem Site im Mittel zu einer balancierten Chromosomenmutation, einer Restitution und zu vier unbalancierten Chromosomenmutationen führen, durch die Umrechnung der theoretischen, primären Binomialverteilung zweifach getroffener Sites zur Verteilung der chromosomalen Mutationen pro Nachkommen. Auch in diesem Fall ergibt sich bei jedem Stamm und bei jeder Dosis eine Übereinstimmung mit den experimentell erhaltenen Verteilungen, wenn im Pronukleus bei bs maximal 13 Sites und bei as 20 Sites entstehen. In Anbetracht der komplizierten, der Rechnung zugrundeliegenden Verhältnisse, die sich aus dem Absterben der Embryonen mit einer oder mehreren, unbalancierten Chromosomenmutationen und aus Restitution eines oder mehrerer Sites ergeben, ist eine rein zufällige Übereinstimmung zwischen theoretischen und experimentell erhaltenen Verteilungen sehr unwahrscheinlich. Zudem stimmen die berechneten mit den gefundenen Verteilungen besser überein als beim Vergleich jeder einzelnen, gefundenen Verteilung mit der entsprechenden Poissonverteilung. Insbesondere ist bei den höchsten Strahlendosen mit der Poissonverteilung keine Übereinstimmung mehr zu erreichen,

während die Umrechnung der theoretischen Binomialverteilung eine statistisch gesicherte Übereinstimmung mit der experimentell erhaltenen Verteilung ergibt. Dieses Ergebnis wäre auch theoretisch zu erwarten, denn bei niedrigen Dosen, bei einem Mittelwert von 1 - 3 getroffenen Sites pro Nachkommen, unterscheiden sich Poissonverteilungen nicht wesentlich von Binomialverteilungen mit maximal 13 Sites bei b_s , bzw. 20 Sites bei a_s und mit der Wahrscheinlichkeit für 2 Treffer pro Site $p = (1 - e^{-kD})^2$, $k = 0,000325$. Eine größere Abweichung zwischen Poisson- und Binomialverteilung ergibt sich erst bei den höchsten Dosen, bei 5 getroffenen Sites. Insgesamt bestätigt die Berechnung auch die Annahme von Wolff (1963), wonach sich bei Erhöhung der Dosis die Häufigkeit der Aberrationen pro Nachkommen nicht mit dem Quadrat der Dosis vergrößert, sondern mit dem Ausdruck $(1 - e^{-kD})^2$.

Die Tendenz zur systematischen, von niedrigen zu höheren Dosen zunehmenden Abweichung zwischen berechneten und experimentell erhaltenen Verteilungen läßt die Vermutung zu, daß ein weiterer, dosisabhängiger Faktor bei der Berechnung nicht berücksichtigt wurde. Diese Tendenz wiederholt sich im Vergleich der beobachteten mit den berechneten Überlebensraten. Zum einen wäre es denkbar, daß sich hierin die Vernachlässigung der 3-Bruchaberrationen, die einen höheren Letalitätsanteil bedingen, bemerkbar macht, zum anderen könnten letal - wirkende Chromatidaberrationen nach der Segregation der Chromatiden eliminiert werden, so daß vom zweiten, vitalen Teilungskern die Embryonalentwicklung ausgeht (Leigh und Sobels 1970). In jedem Fall sind die Abweichungen nicht signifikant und sollten somit die Schätzung der maximalen Sitezahl bei a_s und b_s nur geringfügig beeinflussen.

Übereinstimmend mit der cytologischen Untersuchung an Riesenchromosomen nach Bestrahlung von Spermien, wonach die höhere Strahlensensitivität des as-Stammes im Vergleich zum bs-Stamm mit einer Erhöhung der Sitezahl korreliert sein sollte, ergibt die Berechnung eine höhere Sitezahl bei as und eine niedrigere bei bs. Der as-Stamm unterscheidet sich vom bs-Stamm in der geschätzten Siteanzahl um den Faktor 1,5 und in der beobachteten Strahlensensitivität um den Faktor 1,3. Eine ähnliche Abhängigkeit zwischen Strahlensensitivität und Sitezahl wurde als Ursache für die höhere Mutationsrate und die bevorzugte Entstehung von kleinen Inversionen bei Phryne gegenüber Drosophila angenommen. Auch diese cytologischen Befunde werden durch die Schätzung der Siteanzahl bei Drosophila (Bauer 1939) und bei Phryne ergänzt. Danach erhöht sich die Siteanzahl von Drosophila mit 4 - 8 Sites zu Phryne (bs) mit 13 Sites zu Phryne (as) mit 20 Sites parallel mit der beobachteten Strahlensensitivität.

Soweit lassen sich alle Befunde gemeinsam dahin auslegen, daß die Reparaturvorgänge in einem Site im Mittel eine balancierte Chromosomenmutation, eine Restitution und vier unbalancierte Chromosomenmutationen bedingen. Dieses Ergebnis wäre zu erwarten, wenn einige Sites vor und andere nach der Replikation der Chromosomen im Pro-nukleus repariert werden und falls, wie bereits vermutet, Reparaturvorgänge vor oder nach der Replikation unterschiedliche Folgen haben. Ferner weisen die Berechnungen darauf hin, daß die Entstehung von Chromosomenmutationen und von Restitutionen größtenteils auf statistische Gesetzmäßigkeiten beruht. Insofern entspricht die allgemeine Übereinstimmung zwischen den Häufigkeiten von Restitutionen und balancierten Chromosomenmutationen

der Erwartung, daß vor der Replikation Restitutionen, balancierte Chromosomenmutationen und unbalancierte Chromosomenmutationen im Verhältnis 1 : 1 : 1 entstehen sollten, während die postreplikativen Reparaturvorgänge hauptsächlich zur Erhöhung der Anzahl von unbalancierten Chromosomenmutationen beitragen. In diesem Fall erlauben die unbalancierten Chromosomenmutationen eine ungefähre Bestimmung der Häufigkeiten von prae- und postreplikativen Reparaturvorgängen. Danach sollten 50 % der Reparaturvorgänge vor der Replikation und weitere 50 % nach der Replikation ablaufen, um im Mittel zu einer Restitution, einer balancierten Chromosomenmutation und vier unbalancierten Chromosomenmutationen zu führen.

Diese Annahme wird durch den Befund gestützt, daß nach Bestrahlung von menschlichen Fibroblastenzellen mit UV-Licht etwa 50 % der induzierten Thymin - Dimere innerhalb weniger Minuten aus der DNS ausgeschnitten werden, während die restlichen 50 % erst nach 24 - 100 Stunden, wahrscheinlich erst während oder nach der Replikation, aus der DNS eliminiert werden können (Wilkins und Hart 1974). Aufgrund von Untersuchungen zur strukturellen Organisation des Chromoatins in Eukaryonten, wonach etwa 50 % der DNS fest mit Histonen assoziiert ist (Clark und Felsenfeld 1971), läßt sich der Befund von Wilkins und Hart (1974) bisher am besten so deuten, daß etwa 50 % aller Läsionen in den Chromatinbereichen auftreten, in denen die DNS mit Histonen assoziiert vorliegt, so daß 50 % aller Läsionen durch Proteine "maskiert" werden und für Reparaturenzyme nur schwer zugänglich sind.

Anhaltspunkte für zwei Bruchtypen mit unterschiedlicher Lebensdauer nach Röntgenbestrahlung von Vicia - Zellen

erhielten Wolff und Luippold (1956). Zum einen scheint ein sehr "kurzlebiger" Bruchtyp, dessen Lebensdauer etwa eine Minute beträgt und zum anderen ein "langlebiger" Bruchtyp, mit einer Lebensdauer von wenigstens zwei Stunden, induziert zu werden. Entsprechend den Befunden von Wilkins und Hart (1974) geht die unterschiedliche Lebensdauer vermutlich nicht auf verschiedene Bruch"typen", sondern auf die unterschiedliche Lage der Brüche in verschiedenen Bereichen des Chromatins zurück.

Insbesondere dann, wenn für die Reparatur strahlen-geschädigter Chromosomen nur wenig Zeit zur Verfügung steht, könnte die strukturelle Organisation des Chromatins die relativen Häufigkeiten der Reparaturvorgänge an ein-strängigen oder an replizierten Chromosomen entscheidend beeinflussen. Bei Drosophila müssen die Reparaturvorgänge in der Zygote innerhalb einer Zeitspanne von maximal 15 Minuten abgeschlossen sein (Würgler 1971). Aufgrund der für Eukaryonten charakteristischen DNS-Histon Assoziation würde somit der Annahme, daß im Pronukleus nur 50 % aller strahleninduzierten Läsionen vor der Replikation repariert werden, die strukturelle Organisation des Chromatins zugrunde liegen.

Zusammenfassung

Nach Bestrahlung von Spermien des bs-Stammes von Phryne cincta ergibt sich im Vergleich zu Drosophila melanogaster eine höhere Sensitivität. Das gilt sowohl für die Induktion von chromosomalen, als auch von dominant-letalen Mutationen. Bei Phryne sind Inversionen häufiger als Translokationen.

Die Analyse der Translokations-Bruch-Abstandsdifferenzen weist auf eine Polfeldorientierung der Chromosomen im Pronukleus hin. Eine solche Anordnung der Chromosomen wird bestätigt durch die differentielle Färbung der Kinetochorabschnitte, die eine bevorzugte Lage der Kinetochore im basalen Drittel des Spermiums ergibt.

Die intrachromosomale Bruchverteilung weicht von der Erwartung bei einer zufälligen Verteilung stark ab, dagegen stimmt die intrachromosomale Bruchverteilung mit der relativen Länge der Chromosomen überein. Die Bruchhäufigkeit in 10 Abschnitten pro Chromosomenarm ergibt ein Maximum im proximalen, medianen und distalen Abschnitt.

Aus der dominanten Letalität nach Vorbehandlung der Spermien mit O_2 , N_2 oder Luft und anschließender Bestrahlung errechnet sich der OER-Wert mit etwa 1,9 und der AER-Wert mit 1,5.

Die Beziehung zwischen chromosomaler Mutationsrate und Überlebensrate bei Drosophila stimmt mit der bei Phryne überein.

Nach Bestrahlung des as-Stammes von Phryne cincta ergibt sich eine Erhöhung der chromosomalen Mutabilität und der dominanten Letalität gegenüber dem bs-Stamm um den Faktor 1,33. Parallel dazu sind beim as-Stamm die Inversionslängen, das Verhältnis zwischen Inversionen und Translokationen sowie die Translokations-Bruch-Abstandsdifferenzen verändert. Bei beiden Stämmen ist die mittlere

Länge von kleinen Inversionen mit dem mittleren Umfang einer Windung in den Polytänochrosomen identisch.

Behandlung von Spermien des bs- und as-Stammes mit Trenimon führt zu unterschiedlichen, embryonalen Sterberaten der beiden Stämme. Bei den Überlebenden sind nur wenige chromosomale Aberrationen aufzufinden. Etwa zwei Drittel aller mutierten Tiere sind Halbseiten- oder Anterior-Posterior - Mosaik. Die Mutationsrate bei den Männchen ist etwa doppelt so hoch wie bei den Weibchen.

Natriumfluorid wirkt in Kombination mit Trenimon als starkes Antimutagen. Der Verlauf der Dosiseffektkurven für dominante Letale nach Trenimon, bzw. nach Trenimon plus Natriumfluorid Behandlung weist auf einen Einfluß strukturbestimmender Proteine auf die Entstehung von Chromatidaberrationen hin.

Die theoretische, primäre Binomialverteilung zweifach getroffener Sites läßt sich in die gefundene Verteilung chromosomaler Aberrationen pro Nachkommen überführen, wenn angenommen wird, daß neben jeder balancierten Chromosomenmutation eine Restitution und vier unbalancierte Chromosomenmutationen entstanden sind. Danach ist die maximale Siteanzahl bei Phryne etwa 2 - 3mal größer als bei Drosophila und beim as-Stamm um den Faktor 1,5 größer als beim bs-Stamm.

Die Berechnungen und die Ergebnisse enthalten die Forderungen, daß 1.) eine Verkleinerung des Spiraldurchmessers in Pronukleuschrosomen eine Erhöhung der Siteanzahl und der Strahlensensitivität bedingt, 2.) ein Doppelstrangbruch in der DNS nicht die chromosomale Kontinuität zerstört, 3.) die Verbindung der Bruchenden in einem Site zufällig erfolgt und 4.) 50 % der zweifach getroffenen Sites vor und 50 % nach der Replikation der Chromosomen im Pronukleus repariert werden.

Literaturverzeichnis

- Adkisson, K.P., Perreault, W.J., Gay, H.: Differential fluorescent staining of *Drosophila* chromosomes with quinacrine mustard. *Chromosoma* (Berl.) 34, 190-205 (1971)
- Ahnström, G., Natarajan, A.T.: Repair of gamma-ray and neutron induced lesions in germinating barley seeds. *Int. J. Radiat. Biol.* 19, 433-443 (1971)
- Altenburg, E.: The limit of radiation frequency effective in producing mutations. *Amer. Nat.* 62, 540-545 (1928)
- Bakayev, V.V., Melnikov, A.A., Osicka, V.D., Varshavsky, A.J.: Studies on chromatin. II. Isolation and characterization of chromatin subunits. *Nucleic Acid Res.* 2, 1401-1419 (1975)
- Baker, T.G.: Comparative aspects of the effects of radiation during oogenesis. *Mutation Res.* 11, 9-22 (1971)
- Basler, A., Buselmaier, B., Röhrborn, G.: Elimination of spontaneous and chemically induced chromosome aberrations in mice during early embryogenesis. *Hum. Genet.* 33, 121-130 (1976)
- Bauer, H.: Die Chromosomenmutationen. *Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-L.* 76, 309-322 (1938)
- Röntgenauslösung von Chromosomenmutationen bei *Drosophila melanogaster*. I. Bruchhäufigkeit, -verteilung und Rekombination nach Speicheldrüsenuntersuchung. *Chromosoma* (Berl.) 1, 343-390 (1939)

- Röntgenauslösung von Chromosomenmutationen bei *Drosophila melanogaster*. II. Die Häufigkeit des primären Bruchereignisses nach Untersuchungen am Ring-X-Chromosom. *Chromosoma* (Berl.) 2, 407-458 (1942)
- , Lerche, W.: Die Auslösung von zygotisch-letalen Mutationen bei *Phryne fenestralis* durch Röntgenbestrahlung der Spermien. *Chromosoma* (Berl.) 2, 482-492 (1943)
- Becker, H.J.: Untersuchungen zur Wirkung des Heterochromatins auf die Genmanifestierung bei *D. melanogaster*. *Zool. Anzeige Suppl.* 24, 283-291 (1961)
- Beermann, W. (ed.): *Developmental studies on giant chromosomes*. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York (1972)
- Beek, B., Obe, G.: Differential chromosome radio-sensitivity within the first G_1 -phase of the cell cycle of early-dividing human leucocytes in vitro after stimulation with PHA. *Hum. Gen.* 35, 209-218 (1977)
- Ben-Ishai, R., Peleg, L.: Excision repair in primary cultures of mouse embryo cells and its decline in progressive passages and established cell lines. In: *Molecular mechanisms for the repair of DNA* (P.C. Hanawalt and R.B. Setlow, eds.), part B, p. 607-610 (1975)
- Bender, M.A., Griggs, G.H., Bedford, J.S.: Mechanisms of chromosomal aberration production. III. Chemicals and ionizing radiation. *Mutation Res.* 23, 197-212 (1974)
- Benzer, S.: On the topography of the genetic fine structure. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 47, 403-415 (1961)
- Borstel, R.C. von, Rekemeyer, M.L.: Radiation induced and genetically contrived dominant lethality in *Habrobracon* and *Drosophila*. *Genetics* 44, 1053-1074 (1959)

- Brandt, K.: Untersuchungen zur kombinativen Wirkung von Natriumfluorid mit Athylenimin, Röntgenstrahlen und Bleomycin auf menschliche Lymphozyten in vitro. Diplomarbeit, Freie Universität Berlin (1975)
- Brewen, J.G., Payne, H.S., Jones, K.P., Preston, R.J.: Studies on chemically induced dominant lethality. I. The cytogenetic basis of MMS induced dominant lethality in post-meiotic male germ cells. *Mutation Res.* 33, 239-250 (1975)
- Büchi, R., Bürki, K.: The origin of chromosome aberrations in mature sperm of *Drosophila*: Influence of sodium fluoride on treatments with Trenimon and 1-phenyl-3,3-Dimethyltriazene. *Archiv für Genetik* 48, 59-67 (1975)
- Clark, R.J., Felsenfeld, G.: Structure of chromatin. *Nature new Biol.* 229, 101-111 (1971)
- Cleaver, J.E.: Xeroderma pigmentosum; a human disease in which an initial stage of DNA repair is defective. *Proc. Nat. Acad. Sci. (U.S.)* 63, 428-435 (1969)
- Corry, P.M., Cole, A.: Double strand rejoining in mammalian DNA. *Nature* 245, 100-101 (1973)
- Crick, F.H.C., Klug, A.: Kinky helix. *Nature* 255, 530-533 (1975)
- Crow, J.F.: Ionizing radiation and evolution. In: *Facets of genetics, readings from scientific American*, p. 228-237. W.H. Freeman and Company, San Francisco, 1970
- Datta, P.K., Frigger, H., Schleiermacher, E.: The effect of chemical mutagens on the mitotic chromosomes of the mouse, in vivo. In: *Chemical mutagenesis in mammals and man* (F. Vogel and G. Röhrborn, eds.), Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York (1970)

- Dertinger, H., Jung, H. (ed.): Molekulare Strahlenbiologie. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York (1969)
- Dewey, W.C., Noel, J.S., Dettor, C.M.: Changes in radio-sensitivity and dispersion of chromatin during the cell cycle of synchronous Chinese hamster cells. *Rad. Res.* 52, 373-394 (1972)
- Dobzhansky, T. (ed.): Genetics and the origin of species. New York: Columbian Univ. Press, 1951
- Drake, J.W. (ed.): The molecular basis of mutation. Holden-Day Inc., San Francisco, California, 1970
- Drake, J.W. et al.: Environmental mutagenic hazards. *Science* 187, 503-514 (1975)
- Dressler, B., Schmid, M.: Specific arrangement of chromosomes in the spermiogenesis of *Gallus domesticus*. *Chromosoma (Berl.)* 58, 387-391 (1976)
- Edwards, F.W.: Notes on the dipterous family Anisopodidae. *Ann. Mag. Nat. Hist.* 9, 475-494 (1923)
- Evans, H.J.: Chromosome aberrations induced by ionizing radiations. *Intern. Rev. Cytol.* 13, 221-321 (1962)
- Scott, D.: Influence of DNA synthesis on the production of chromatid aberrations by X-rays and maleic hydrazide in *Vicia faba*. *Genetics* 19, 17-38 (1964)
- Fox, D.P.: The effects of X-rays on the chromosomes of locust embryos. I. The early responses. *Chromosoma (Berl.)* 19, 300-316 (1966 a)
- The effects of X-rays on the chromosomes of locust embryos. II. Chromatid interchanges and the organization of the interphase nucleus. *Chromosome (Berl.)* 20, 173-194 (1966 b)

- Gatti, M., Pimpinelli, S., Santini, G.: Characterization of *Drosophila* heterochromatin. I. Staining and decondensation with Hoechst 33258 and quinacrine. *Chromosoma* (Berl.) 57, 351-375 (1976)
- Gebhard, E.: Antimutagens. *Humangenetik* 24, 1-32 (1974)
- Geitler, L. (ed.): *Chromosomenbau. Protoplasma-Monographien*, Band 14. Berlin: Verlag von Gebrüder Bornträger, 1938
- Glass, H.B.: A comparative study of induced mutations in the oocytes and spermatozoa of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 40, 252-267 (1955)
- Gonzales, F.W.: Dose-response kinetics of genetic effects induced by 250 kVp X-rays and 0,68 MeV neutrons in mature sperm of *Drosophila melanogaster*. *Mutation Res.* 15, 303-334 (1972)
- Hadorn, E. (ed.): *Developmental genetics and lethal factors*. London: Methuen and Co., Ltd., 1961
- Haldane, J.B.: The cost of natural selection. *Journal of Genetics* 55, 511-524 (1957)
- Hanawalt, P.C.: Reparatur genetischen Materials in lebenden Zellen. *Endeavour* 31, 83-87 (1972)
- Setlow, R.B. (eds.): *Molecular mechanisms for repair of DNA*. First Edit. New York - London: Plenum Press (1975)
- Hannah, A.: Localization and function of heterochromatin in *Drosophila melanogaster*. *Adv. in Genetics* 4, 87-125 (1951)
- Heddle, J.A., Bodycote, D.C.: On the formation of chromosomal aberrations. *Mutation Res.* 9, 117-126 (1970)

- Heiner, R.E.: Alterations in the nuclear cycle, mitotic index and chromosomes of *Vicia* as affected by di-ethyl-sulfate, *Mutation Res.* 12, 249-254 (1971)
- Heitz, E.: Über alpha- und beta-Heterochromatin sowie Konstanz und Bau der Chromosomen bei *Drosophila*. *Biol. Zbl.* 54, 588-609 (1934)
- Hertwig, P.: Mutationsforschung in ihrer Bedeutung für die Evolution. *Nova Acta Leopoldina* 21, 117-145 (1959)
- Holmberg, M.: Lack of synergistic effect between X-ray and UV irradiation on the frequency of chromosome aberrations in PHA-stimulated human lymphocytes in the G₁ stage. *Mutation Res.* 34, 141-148 (1976)
- Hotta, Y., Stern, H.: Analysis of DNA-synthesis during meiotic prophase in *Lilium*. *J. Mol. Biol.* 55, 337-355 (1971)
- Hsu, T.C.: Heterochromatin pattern in metaphase chromosomes of *Drosophila melanogaster*. *Journal of Heredity* 62, 285-287 (1971)
- Israelewski, N.: Strahleninduzierte Chromosomenmutationen bei *Phryne cincta*. Diplomarbeit, Freie Universität Berlin, 1974
- : X-ray induced visible alterations in the giant chromosomes of *Phryne cincta* (Nematocera, Diptera). Relation of radiation sensitivity to pronuclear chromosome structure. *Chromosoma (Berl.)* 53, 243-263 (1975)
- , Obe, G.: Suppressive activity by fluoride on the induction of dominant lethals with trenimon in spermatozoa of *Phryne cincta* (Nematocera, Diptera). *Mutation Res.* in press (1977)
- Kaufmann, B.P.: Organization of the chromosome. I. Break distribution and chromosome recombination in *Drosophila melanogaster*. *J. exp. Zool.* 102, 293-320 (1946)

- Keyl, H.G.: Untersuchungen am Karyotypus von *Chironomus thummi*. II. Strukturveränderungen an den Speicheldrüsenchromosomen nach Röntgenbestrahlung von Embryonen und Larven. *Chromosoma* (Berl.) 9, 441-483 (1958)
- Kilgore, W.W., Douth, R. L. (eds.): *Pest control*. New York und London: Academic Press, 1967
- Kornberg, R.D.: Chromatin structure: a repeated unit of histones and DNA. *Science* 184, 868-875 (1974)
- Kusyk, C.J., Hsu, T.C.: Adriamycin-induced chromosome damage: Elevated frequencies of isochromatid aberrations in G₂ and S-phase. *Experientia* 32, 1013-1014 (1976)
- Lachance, L.E., Crystal, M.M.: Induction of dominant lethal mutations in insect oocytes and sperm by gamma rays and an alkylating agent: Dose-response and joint action studies. *Genetics* 51, 690-708 (1965)
- Riemann, J.G.: Cytogenetic investigations on radiation and chemically induced dominant lethal mutations in oocytes and sperm of the screw-worm fly. *Mutation Res.* 1, 318-333 (1964)
- Lea, D.E.: The induction of chromosome structural changes by radiation: detailed quantitative interpretation. *Brit. J. Radiol., Suppl.* 1, 75-83 (1947)
- Leigh, B., Sobels, F.H.: Induction of X-rays of isochromosomes in the germ cells of *Drosophila melanogaster* males; evidence for nuclear selection in embryogenesis. *Mutation Res.* 10, 475-487 (1970)
- Lima-de-Faria, A.: The chromosome field. I. Prediction of the location of ribosomal cistrons. *Hereditas* 83, 1-22 (1976 a)

- The chromosome field. II. The location of "knobs" in relation to telomeres. *Hereditas* 83, 23-34 (1976 b)
- Linnert, G.: Die Struktur der Pachytänchromosomen im Eu- und Heterochromatin und ihre Auswirkung auf die Chiasmabildung bei *Salvia*-Arten. *Chromosoma* (Berl.) 7, 90-128 (1955)
- Lohr, D., Corden, J., Tatchell, K., Kovacic, T.R., Van Holde, K.E.: Comparative subunit structure of Hela, yeast and chicken erythrocyte chromatin. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 74, 79-83 (1977)
- Lowman, F.G.: Electron-microscope studies of *Drosophila* salivary-gland chromosomes. *Chromosoma* (Berl.) 8, 30-52 (1956)
- Lu, B.C., Chin, S.M.: Genetic recombination in *Coprinus*. V. Repair synthesis of deoxyribonucleic acid and its relation to meiotic recombination. *Molec. gen. Genet.* 147, 121-127 (1976)
- Lüers, H., Röhrborn, G.: Chemische Konstitution und mutagene Wirkung. III. Äthylenimine. *Mutation Res.* 2, 29-44 (1965)
- Sperling, K., Wolf, B.E.: Genetik und Evolutionsforschung bei Tieren. In: G. Heberer (ed.), *Die Evolution der Organismen*, Band II, 190-363, Stuttgart: Gustav Fischer Verlag, 1974
- MacGregor, H.C., Walker, M.H.: The arrangement of chromosomes in nuclei of sperm from plethodontid salamanders. *Chromosoma* (Berl.) 40, 243-262 (1973)
- Maddern, R.H., Leigh, B.: The timing of the restitution of chromosome breaks induced by X-rays in the mature sperm of *Drosophila melanogaster*. *Mutation Res.* 41, 255-268 (1976)

- Matter, B., Jaeger, I.: Premature chromosome condensation, structural chromosome aberrations, and micronuclei in early mouse embryos after treatment of paternal post-meiotic germ cells with triethylenemelamine: Possible mechanisms for chemically induced dominant lethal mutations. *Mutation Res.* 33, 251 - 260 (1975)
- Mendelson, D.: Lack of effect of sodium fluoride on a maternal repair system in *Drosophila* oocytes. *Mutation Res.* 34, 245-250 (1976)
- Meselson, M., Stahl, F.W.: A classic experiment in molecular biology, showing that DNA replication involves the separation of the two complementary polynucleotide chains. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 44, 671 (1958)
- Muller, H.J.: Artificial transmutation of the gene. *Science* 66, 84-87 (1927)
- The nature of genetic effects produced by irradiation. In: A. Hollaender (ed.), *Radiation biology*, Vol.1, pp. 351-626, New York: Mc Graw Hill, 1954
- Myers, H.S., Barry, B.D., Burnside, J.A., Rhode, R.H.: Sperm precedence in female apple maggots alternately mated to normal and irradiated males. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 69, 39 - 41 (1976)
- Natarajan, A.T.: Molecular aspects of the origin of chromosome structural changes. *Biol. Zbl.* 95, 139-156 (1976)
- Nöthel, H.: Investigations on radiosensitive and radio-resistant populations of *Drosophila melanogaster*. I. Decreased radiosensitivity in stage-7 oocytes of the irradiated population Rö I. *Mutation Res.* 10, 463-475 (1970)
- Nomura, M., Benzer, S.: The nature of the "deletion" mutants in the rII region of the phage T4. *J. Mol. Biol.* 3, 684-692 (1961)

- Novitski. E. : The origin of mosaics.
Drosophila Inform. Serv. 38, 71 (1963)
- Obe, G.: Chemische Konstitution und mutagene Wirkung.
V. Vergleichende Untersuchung der Wirkung von Äthylen-
imininen auf menschliche Leukozytenchromosomen.
Mutation Res. 6, 467-471 (1968)
- Die Verteilung chemisch induzierter achromatischer
Läsionen und Brüche auf den Chromatiden menschlicher
Leukozytenchromosomen. Chromosoma (Berl.) 26,
475-479 (1969)
- Inter- und intrachromosomale Verteilung spontaner
achromatischer Läsionen und Chromatidbrüche.
Chromosoma (Berl.) 33, 403-408 (1971)
- , Slacik-Erben, R.: Suppressive activity by fluoride
on the induction of chromosome aberrations in human
cells with alkylating agents in vitro.
Mutation Res. 19, 369-371 (1973)
- Oelkers, F., Eberle, P.: Spiralen und Chromomeren in der
Meiosis von *Bellevalia romana*. Chromosoma (Berl.) 8,
351-363 (1956)
- Oster, I.I.: Radiosensitivity.
Genen en Phaenen 3, 53-66 (1958)
- Oudet, P., Gross-Bellard, M., Chambon, P.: Evidence for
a subunit organization of chromatin. Cell 4,
282-298 (1975)
- Painter, R.B., Wolff, S.: Apparent absence of repair
replication in *Vicia faba* after X-irradiation.
Mutation Res. 19, 133-137 (1973)
- Rasch, E.H., Barr, H.J., Rasch, R.W.: The DNA content
of sperm of *Drosophila melanogaster*.
Chromosoma (Berl.) 33, 1-18 (1971)

- Revell, S.H.: A new hypothesis for "chromatid" changes.
In: Z.M. Bacq und P. Alexander (ed.): Radiation
biology, Symp. Liege 1954, pp. 243-253, London:
Butterworths 1955
- Revell, S.H.: Evidence for a dose squared term in the
dose-response curve of real chromatid discontinuities
induced by X-rays, and some theoretical consequences
there of. Mutation Res. 3, 34-53 (1966)
- Rieger, R.: Die Genommutationen. In: H. Stubbe (ed.),
Genetik, Grundlagen, Ergebnisse und Probleme in Einzel-
darstellung, Beitrag 3, Jena: Fischer 1963
- , Michaelis, A.: Vergleichende Untersuchung zur Ver-
teilung durch verschiedene Mutagene induzierter
Brüche über den Chromosomensatz von *Vicia faba*.
Chromosoma (Berl.) 10, 163-178 (1959)
- , Michaelis, A.: Chromosomenmutationen. In: H. Stubbe (ed.),
Genetik, Grundlagen, Ergebnisse und Probleme in
Einzeldarstellung, Beitrag 6, Jena: Fischer 1967
- Ris, H., Kubai, D.F.: Chromosome structure.
Annual Rev. of Genetics 4, 263-294 (1970)
- Robinson, A.S.: Genetic control of *Hylemya antiqua*.
I.X-ray induced effects in the F_0 and F_1 generations.
Mutation Res. 42, 79-88 (1977)
- Russel, L.B.: Death and chromosome damage from irradiation
of preimplantation stages. In: G. E. W. Wolstenholme
and M. O'Connor (eds.), Preimplantation stages of
pregnancy, Ciba Foundation Symp., pp. 217-241,
Boston: Little, Brown and Co. 1965
- Sankaranarayanan, K.: Genetic loads in irradiated experi-
mental population of *Drosophila melanogaster*.
Genetics 50, 131-150 (1964)

- Sankaranarayanan, K.: X-ray induction of dominant lethals in late spermatids and mature spermatozoa of *Drosophila melanogaster*. *Mutation Res.* 24, 307-316 (1974)
- Sax, K.: Analysis of X-ray induced chromosomal aberrations in *Tradescantia*. *Genetics* 25, 41-68 (1940)
- Schleiermacher, E.: The activity of alkylating agents. II. Histological and cytogenetic findings in spermatogenesis. In: E. Vogel und G. Röhrborn (eds), *Chemical mutagenesis in mammals and man*. Berlin, Heidelberg, New York: Springer Verlag, 1970
- Schmid, M., Krone, W.: Acrosomal chromocenter in newt spermiogenesis. *Nature* 257, 795-797 (1975)
- , Krone, W.: The relationship of a specific chromosomal region to the development of the acrosom. *Chromosoma (Berl.)* 56, 327-347, (1976)
- Sega, G.A., Cumming, R.B., Walton, M.F.: Dosimetry studies on the ethylation of mouse sperm DNA in vivo exposure to ^3H -ethyl methanesulfonate. *Mutation Res.* 24, 317-333 (1974)
- Setlow, R.B., Regan, J.D., German, J., Carrier, W.L.: Evidence that Xeroderma pigmentosum cells do not perform the first step in the repair of ultraviolet damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.)* 64, 1035-1041 (1969)
- Slacik-Erben, R.: Wirkung von Trenimon, Natriumfluorid und deren Kombination auf den Zellzyklus und die Rate chromosomaler Aberrationen in menschlichen Lymphozytenkulturen in vitro. Dissertation, Freie Universität, Berlin (1976)
- , Obe, G.: The effect of sodium fluoride on DNA-synthesis, mitotic indices and chromosomal aberrations in human leukocytes treated with trenimon in vitro. *Mutation Res.* 37, 253-266 (1976)

- Slizynska, H.: Mutagenic effects of X-rays and formaldehyde food in spermatogenesis of *Drosophila melanogaster*. Genet. Res. Camb. 4, 248-257 (1963)
- : Cytological of storage effects on various types of complete and mosaic change induced in *Drosophila* chromosomes by some chemical mutagens. Mutation Res. 19, 199 213 (1973)
- Smith, P.D.: Mutagen sensitivity of *Drosophila melanogaster*. III. X-linked loci governing sensitivity to methyl methanesulfonate. Molec. gen. Genet. 149, 73-85 (1976)
- Sobels, F.H.: A dose-fractionation study to determine how long breaks induced in various stages of spermatogenesis of *Drosophila* stay open. Rev. Suisse Zool. 79, 143 152 (1972)
- Sokoloff, S., Zacharias, H.: Functional significance of changes in the shape of the polytene X-chromosome in *Phryne*. Chromosoma (Berl.) in press (1977)
- Sperlich, D.: Populationsgenetik. Grundlagen der modernen Genetik, Band 8, Stuttgart: Gustaf Fischer Verlag, 1973
- Stadler, L.J.: Mutations in barley induced by X-rays and radium. Science 68, 186 (1928)
- : On the genetic nature of induced mutations in plants. Proc. 4. Int. Congr. Genetics 1, 274 294 (1932)
- Sturtevant, A.H.: The effects of unequal crossing over at the Bar locus in *Drosophila*. Genetics 10, 117-147 (1925)
- Sumner, A.T.: A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. Exp. Cell Res. 75, 304, 304-306 (1972)

- Swift, H.: The organisation of genetic material in eukaryotes: Progress and prospects.
Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol. 37, 963-979 (1973)
- Taylor, J.H.: The time and mode of duplication of chromosomes. Amer. Nat. 91, 209-222 (1957)
- Thacker, J., Cox, R.: Mutation induction and inactivation in mammalian cells exposed to ionizing radiation.
Nature 258, 429-431 (1975)
- Traut, H.: Experiments on the mechanisms of X-ray induced chromosome loss. Mutation Res. 6, 109-115 (1968)
- Van de Flied, K.: No multistrandness in mitotic chromosomes of *Drosophila melanogaster*.
Chromosoma (Berl.) 50, 431-434 (1975)
- Varshavsky, A.J.: Structural and functional organization of eukaryotic chromosomes.
Biol. Zbl. 95, 301-316 (1976)
- Vogel, E.: Strong antimutagenic effects of fluoride on mutation induction by trenimon and 1-phenyl-3,2-dimethyltriazene in *Drosophila melanogaster*.
Mutation Res. 20, 339-352 (1973)
- Watson, W.A.F.: Studies on a recombination-deficient mutant of *Drosophila*. 1. Dominant lethals.
Mutation Res. 8, 91-100 (1968)
- : Studies on a recombination-deficient mutant of *Drosophila*. 2. Response to X-rays and alkylating agents, Mutation Res. 14, 299-307 (1971)
- Wheeler, G.P.: Studies related to the mechanisms of action of cytotoxic alkylating agents: A review
Cancer Res. 22, 651-688 (1962)

- White, M.J.D. : Chromosomal rearrangements and speciation in animals. Annual. Rev. Genetics 3, 75-98 (1969)
- Wilkins, R.J., Hart, R.W.: Preferential DNA repair in human cells. Nature 247, 35-36 (1974)
- Witthehouse, H.L.K.: A theory of crossing over by means of hybrid deoxyribonucleic acid. Nature 199, 1034-1040 (1963)
- Wolf, B.E.: Nachweis eines lokalisierten Chromatidenstück austausches im X-Chromosom von *Phryne cincta* mit Hilfe der Speicheldrüsenanalyse.
Verh. d. Dtsch. Zool., 283-297 (1956)
- Wolf, B.E.: Kontrolle des crossing over vom temperaturbedingten Allozykliegrad und vom alpha-Heterochromatin des X-Chromosoms bei *Phryne cincta*
Chromosoma (Berl.) 13, 646-701 (1963)
- Wolff, S.: Mechanisms in radiobiology. In: M.Errera and A.Fossberg (eds.), Radiation genetics, Vol.1, pp.410-475, New York: Academic Press, 1961
- Wolff, S.: The kinetics for two-break chromosome exchanges and the $3/2$ power rule. In: F.H. Sobels (ed.), Repair from genetic radiation damage, pp. 1-10, New York: Pergamon Press, 1963
- Wolff, S., Cleaver, J.E.: Absence of DNA repair replication after chemical mutagen damage in *Vicia faba*.
Mutation Res. 20, 71-76 (1973)
- Wolff, S., Luippold, H.E.: The production of two chemically different types of chromosome breaks by ionizing radiations. Proc. Nat. Acad. Sci., Wash. 42, 510-514 (1956)

Wolstenholme, G.E.W.: Mutation as cellular process.

London: J. and A. Churchill, 1969

Würgler, F.E.: Radiation induced translocations in
inseminated eggs of *Drosophila melanogaster*.

Mutation Res. 13, 353-359 (1971)

Tabellen 7 - 16

Tabelle 7

Zusammenfassung der Werte aus der Chromosomenanalyse von F₁-Tieren des as- und bs-Stammes nach Bestrahlung der P-Männchen:

Anzahl der analysierten Tiere (N)

Anzahl der Tiere mit 0 - 8 Brüchen pro Spermium

Gesamtanzahl der Brüche bei jeder Dosis

Anzahl der chromosomal mutierten Spermien (Tiere)

Gesamtanzahl der Chromosomenmutationen bei jeder Dosis

Anzahl der Inversionen (⁺⁺: intrachromosomale 3-Bruch-
Aberrationen wurden als eine
Inversion gezählt; die Anzahl
der 3-Bruch-Aberrationen ist in
Klammern angegeben)

Anzahl der Translokationen (⁺: interchromosomale 3-Bruch-
Aberrationen wurden als eine
Translokation gezählt, die An-
zahl der 3-Bruch-Aberrationen
ist in Klammern angegeben)

Anzahl der Deletionen

Anzahl der Mosaiktiere

Häufigkeit der chromosomal mutierten Tiere

Anzahl der chromosomalen Aberrationen pro Spermium

Anzahl der chromosomalen Aberrationen pro mutiertes
Spermium

Anzahl der Brüche pro Spermium

Anzahl der Brüche pro mutiertes Spermium

Fortsetzung Tabelle 7

Stamm	Dosis	♂, ♀	mutierte Spermien (n)	Aberrationen (n)	Inversionen (n) ⁺⁺	Translokationen (n) ⁺	Deletionen (n)	Mosaik (n)
as	0,75 KR	♂	17	18				
		♀	20	24				
		♂ + ♀	37	42	23 (1)	19 (1)	0	0
as	1,5 KR	♂	81	99				
		♀	128	171				
		♂ + ♀	209	270	143 (18)	119 (19)	7	1
as	2,25 KR	♂	31	40				
		♀	48	72				
		♂ + ♀	79	112	57 (8)	45 (12)	7	3
bs	1,5 KR	♂	66	78				
		♀	73	89				
		♂ + ♀	139	167	104 (5)	58 (6)	3	2

Fortsetzung Tabelle 7

Stamm Dosis ♂, ♀ mutierte (KR)		Spermien (%)		Aberrationen/Spermium Gesamt		In. Tr. (n)		Aberrationen/ mut. Spermium (n)		Brüche pro Spermium mut. Spermium (n)	
as	0,75	♂	19,32	0,20				1,06	0,42	2,18	
		♀	15,38	0,18				1,20	0,38	2,45	
		♂ + ♀	16,97	0,19	0,11	0,09		1,14	0,39	2,32	
as	1,5	♂	45,25	0,55				1,22	1,20	2,64	
		♀	47,23	0,63				1,34	1,34	2,84	
		♂ + ♀	46,44	0,60	0,32	0,26		1,29	1,28	2,76	
as	2,25	♂	68,89	0,89				1,29	1,89	2,74	
		♀	72,73	1,09				1,5	2,41	3,31	
		♂ + ♀	71,17	1,01	0,51	0,41		1,42	2,20	3,09	
bs	1,5	♂	30,14	0,36				1,18	0,74	2,44	
		♀	32,30	0,39				1,22	0,84	2,60	
		♂ + ♀	31,24	0,38	0,23	0,13		1,20	0,79	2,53	

Tabelle 8

Eisterblichkeit nach Bestrahlung von Spermatozoen von
Phryne cincta zur Bestimmung der applizierten Dosis
(Parallelbestrahlung zum Experiment Chromosomenanalyse).

A: Anzahl der bestrahlten Männchen, bzw.
Anzahl der Pärchenzuchten

N: Zahl der ausgewerteten Embryonen

L: Letale Embryonen

M: Korrigierter Mittelwert aus den Einzel-
experimenten

Fehlerbreite für $p = 0,05$

Tabelle 8

Stamm	Dosis	A	N	L	%L
bs	0	6	974	33	3,39
<u>M = 3,50 + 0,94 (%)</u>					
bs	1,5	6	1010	628	62,18
<u>M = 60,49 ± 3,52 (%)</u>					
as	0	6	947	38	4,01
<u>M = 3,98 + 1,02 (%)</u>					
as	0,75	6	1159	558	48,14
<u>M = 45,92 ± 2,12 (%)</u>					
as	1,5	6	901	681	75,58
<u>M = 74,38 ± 3,23 (%)</u>					
as	2,25	6	783	711	90,80
<u>M = 90,21 ± 1,86 (%)</u>					

Tabelle 9

Eisterblichkeit nach Röntgenbestrahlung reifer Spermien des as- und bs-Stammes von Phryne cincta im Dosisbereich 0 bis 5 KR. Im Experiment IV wurden die ♂♂ für eine halbe Stunde mit N₂ oder O₂ vorbehandelt.

- Experiment I: Jeweils ein bestrahltes bs ♂ gekreuzt mit einem bs ♀
- Experiment II: Jeweils ein bestrahltes as ♂ gekreuzt mit einem as ♀
- Experiment III: Jeweils ein bestrahltes bs ♂ gekreuzt mit einem as ♀, bzw. ein bestrahltes as ♂ mit einem bs ♀
- Experiment IV: Jeweils ein vorbehandeltes und bestrahltes bs ♂ gekreuzt mit einem bs ♀

- Abkürzungen: A : Anzahl der getesteten ♂♂
- N : Gesamtanzahl der ausgewerteten Embryonen
- L : Gesamtanzahl der toten Embryonen
- SL: Anzahl der spätletalen Embryonen
- M : korrigierter Mittelwert und mittlerer Fehler für p = 0,05

Experiment I

Tabelle 9

Stamm	Dosis	A	N	L	SL	%L	%SL
bs x bs	1 KR	7	932	428	73	45,92	20,56
<u>M = 44,27 ± 1,46 (%)</u>							
bs x bs	2 KR	5	808	614	81	75,99	15,20
<u>M = 75,16 ± 1,83 (%)</u>							
bs x bs	3 KR	6	606	554	48	91,42	8,66
<u>M = 91,60 ± 2,18 (%)</u>							
bs x bs	4 KR	4	710	702	27	98,87	3,85
<u>M = 98,92 ± 0,83 (%)</u>							
bs x bs	0	5	829	26	4	3,14	15,38
<u>M = 0,00 ± 0,57 (%)</u>							

Experiment II

Fortsetzung Tabelle 9

Stamm	Dosis	A	N	L	SL	%L	%SL
as x as	1 KR	6	576	327	55	56,77	16,81
<u>M = 55,36 ± 2,90 (%)</u>							
as x as	2 KR	6	666	598	48	89,78	8,03
<u>M = 89,34 ± 1,99 (%)</u>							
as x as	3 KR	6	570	549	33	96,32	6,01
<u>M = 96,92 ± 1,13 (%)</u>							
as x as	4 KR	4	537	536	21	99,81	3,92
<u>M = 99,87 ± 0,25 (%)</u>							
as x as	0	5	754	30	5	3,98	16,67
<u>M = 0,00 ± 0,75 (%)</u>							

Experiment III

Fortsetzung Tabelle 9

Stamm	Dosis	A	N	L	SL	%L	%SL
as x bs	1 KR	5	648	298	63	45,99	21,14
<u>M = 43,18 ± 4,22 (%)</u>							
as x bs	2 KR	7	651	476	60	73,12	12,61
<u>M = 72,10 ± 1,71 (%)</u>							
as x bs	3 KR	7	658	616	56	93,67	9,09
<u>M = 93,24 ± 2,00 (%)</u>							
as x bs	0	4	693	23	2	3,32	8,70
<u>M = 0,00 ± 3,05 (%)</u>							
bs x as	1 KR	6	806	466	77	57,82	16,52
<u>M = 56,68 ± 2,74 (%)</u>							
bs x as	2 KR	6	645	564	63	87,44	11,17
<u>M = 86,17 ± 3,85 (%)</u>							

Fortsetzung Tabelle 9

Stamm	Dosis	A	N	L	SL	%L	%SL
bs x as	3 KR	4	519	498	26	95,95	5,22
	$M = 95,94 \pm 1,16 (\%)$						
bs x as	0	4	641	17	1	2,65	5,88
	$M = 0,00 \pm 1,55 (\%)$						
Experiment IV							
bs x bs	O ₂ , 1 KR	4	610	343	66	56,23	19,24
	$M = 54,66 \pm 4,41 (\%)$						
bs x bs	O ₂ , 2 KR	5	808	707	57	87,50	8,06
	$M = 86,41 \pm 3,89 (\%)$						
bs x bs	O ₂ , 3 KR	7	799	775	63	96,70	8,13
	$M = 96,90 \pm 1,25 (\%)$						

Fortsetzung Tabelle 9

Stamm	Dosis	A	N	L	SL	%L	%SL
bs x bs M = 58,00 ± 5,79 (%)	N ₂ , 2 KR	5	813	486	74	59,78	15,23
bs x bs M = 82,86 ± 3,44 (%)	N ₂ , 3,5 KR	5	549	454	45	82,70	9,91
bs x bs M = 94,43 ± 0,98 (%)	N ₂ , 5 KR	5	605	571	44	94,38	7,71
bs x bs M = 0,00 ± 1,39 (%)	0	4	710	28	2	3,94	7,14

Fortsetzung Tabelle 9

Statistische Beurteilung der Abweichungen der Eisterblichkeit nach Röntgenbestrahlung reifer Spermien des bs- und as-Stammes (t-Test)

bs x bs	1 KR	-	as x as	1 KR	P < 0,001
bs x bs	2 KR	-	as x as	2 KR	P < 0,001
bs x bs	3 KR	-	as x as	3 KR	P < 0,01
bs x bs	4 KR	-	as x as	4 KR	P > 0,05
as x bs	1 KR	-	as x as	1 KR	P < 0,01
as x bs	2 KR	-	as x as	2 KR	P < 0,001
as x bs	3 KR	-	as x as	3 KR	P < 0,01
bs x as	1 KR	-	bs x bs	1 KR	P < 0,001
bs x as	2 KR	-	bs x bs	2 KR	P < 0,01
bs x as	3 KR	-	bs x bs	3 KR	P < 0,01
as x bs	1 KR	-	bs x bs	1 KR	P > 0,05
as x bs	2 KR	-	bs x bs	2 KR	P > 0,05
as x bs	3 KR	-	bs x bs	3 KR	P > 0,05
bs x as	1 KR	-	as x as	1 KR	P > 0,05
bs x as	2 KR	-	as x as	2 KR	P > 0,05
bs x as	3 KR	-	as x as	3 KR	P > 0,05

Tabelle 10

Häufigkeitsverteilung chromosomaler Mutationen pro Spermium nach Bestrahlung des bs-Stammes von Phryne cineta mit 1, 1,5, 2 und 3 KR. Werte für 1, 2 und 3 KR aus: Israelewski (1974). Die experimentell ermittelte Häufigkeitsverteilung bei jeder Dosis wurde mit den Werten aus der Poissonverteilung mit gleichem Mittelwert verglichen (p , χ^2)

- n : beobachtete Anzahl chromosomaler Mutationen pro Spermium in einer gegebenen Klasse
- N : Anzahl analysierter Spermien
- $\bar{X}$: Mittelwert der Verteilung

Tabelle 11

Häufigkeitsverteilung chromosomaler Mutationen pro Spermium nach Bestrahlung des as-Stammes von Phryne cincta mit 0,75, 1,5 und 2,25 KR.

Die experimentell ermittelte Häufigkeitsverteilung bei jeder Dosis wurde mit den Werten aus der Poissonverteilung (Poisson) mit gleichem Mittelwert ($\bar{X}$) verglichen (p , χ^2).

- n : beobachtete Anzahl chromosomaler Mutationen pro Spermium in einer gegebenen Klasse
- N : Anzahl analysierter Spermien
- $\bar{X}$: Mittelwert der Verteilung

Tabelle 11

Dosis	Mutationen pro Spermium				
	0	1	2	3	4
0,75 KR	181	32	5		
	84,0	14,7	2,3		
	82,5	15,9	1,5		
					$n; N = 218$ $\% n$ Poisson $\bar{x} = 0,19$
} $p = 0,25$					
1,5 KR	241	155	48	5	1
	53,6	34,4	10,7	1,1	0,2
	54,9	32,9	9,9	2,0	0,3
					$n; N = 450$ $\% n$ Poisson $\bar{x} = 0,6$
} $p = 0,3$					
2,25 KR	32	53	20	5	1
	28,8	47,8	18,0	4,5	0,9
	36,5	36,8	18,6	6,2	1,6
					$n; N = 111$ $\% n$ Poisson $\bar{x} = 1,01$
} $p = 0,05$					

Tabelle 12

Anzahl der Brüche in jedem Abschnitt der Chromosomenkarte, bzw. in jedem 1/10 Abschnitt pro Chromosomenarm nach Bestrahlung reifer Spermien des bs- und as-Stammes von Phryne cincta.

- K : Kinetochor
- p : Wahrscheinlichkeit für zufällige intrachromosomale Bruchverteilung
- P : Wahrscheinlichkeit für zufällige interchromosomale Bruchverteilung
- q_a, q_b : Erwartungswerte der Bruchhäufigkeiten in jedem Abschnitt bei as oder bs (berechnet aus der Abschnittsanzahl und aus der relativen Länge der Chromosomen)

Tabelle 12

Chromosom 2

Abschnitt		Brüche as (n)	q_a	Brüche bs (n)	q_b
a	1	11	13,07 $p < 0,0027$	4	12,31 $p < 0,0027$
	2	9		8	
	3	19		18	
	4	12		14	
	5	6		14	
	6	18		14	
	7	11		13	
	8	8		25	
	9	14		14	
	10	5		3	
	11	14		15	
	12	18		13	
	13	43		19	
(K)		(27)		(11)	
	14	6		10	
	15	10		10	
	16	11		7	
	17	13		11	
	18	14		14	
	19	14		6	
	20	12		9	
	21	17		16	
	22	13		13	
	23	11		17	
	24	16		12	
	25	10		8	
	26	18		19	
	27	5		10	
	28	8		10	
b	29	13		9	
Summe		379	372,6 $P > 0,5$	357	356,2 $P > 0,95$
Brüche in K		7,12%		3,1%	

Fortsetzung Tabelle 12

Chromosom 3

Abschnitt	Brüche as (n)	q _a	Brüche bs (n)	q _b
a	1	18	14	11,9
	2	5	9	
	3	10	9	
	4	19	15	
	5	6	7	
	6	14	11	
	7	12	17	
	8	10	8	p < 0,01
	9	33	21	
	(K)	(15)	(12)	
	10	7	6	
	11	19	18	
	12	6	8	
	13	6	5	
	14	18	12	
	15	10	4	
	16	24	15	
	17	16	11	
	18	9	14	
	19	8	16	
b	20	15	18	
Summe	265	257,0	238	245,7
		P > 0,5		P > 0,95
Brüche in K	5,7%		5,0%	

Fortsetzung Tabelle 12

Chromosom 4

Abschnitt	Brüche as (n)	q _a	Brüche bs (n)	q _b
1	24		28	
(K)	(24)	12,06	(28)	12,67
2	13		8	
3	15		20	
4	7		7	
5	15		21	
6	11		13	
7	8		13	
8	10	p < 0,0027	11	p < 0,0027
9	14		11	
10	8		6	
11	7		7	
12	6		5	
13	9		10	
14	11		12	
15	7		16	
16	15		19	
17	26		13	
18	11		8	
Summe	217	231,4	228	221,1
		P > 0,5		P > 0,95
Brüche in K	11,1%		12,3%	

Fortsetzung Tabelle 12

Chromosom X

Abschnitt	Brüche X_a (n)	q_a	Brüche X_b (n)	q_b
(K)	(10)		(7)	
1	14	6,57	7	7,5
2	0		7	
3	1		5	
4	1		13	
5	4	$p < 0,0027$	3	$p < 0,05$
6	12		10	
7	14			
Summe	46	54,0	45	37,6

Fortsetzung Tabelle 12

Bruchhäufigkeit in jedem 1/10 Abschnitt pro Chromosomenarm

Abschnitt (X)	Chr. 2a		Chr. 2b		Chr. 3a		Chr. 3b		Chr. 4		Summe _{as}	Summe _{bs}	Summe _{as+bs}
	as	bs	as	bs	as	bs	as	bs	as	bs			
1	42	15	11	16	21	15	8	9	47	46	129	101	230
2	24	23	20	14	16	10	18	16	12	18	90	81	171
3	8	8	14	15	6	13	7	11	23	26	58	73	131
4	15	14	19	16	13	12	15	2	12	23	74	67	141
5	12	27	26	24	13	8	18	15	23	19	92	93	185
6	17	19	25	15	5	6	19	15	15	12	81	67	148
7	14	20	15	22	18	15	10	8	10	11	67	76	143
8	15	18	22	21	9	9	20	17	20	26	86	91	177
9	21	18	22	22	10	14	8	16	23	30	84	100	184
10	15	8	22	22	16	9	15	18	32	17	100	74	174
SUMME											861	823	1684

Tabelle 13

Verteilung von reziproken Translokationen mit verschiedenen Kinetochor-Bruch-Abstandsdifferenzen auf 0 - 17 Klassen (Karteneinheiten).

- n : Anzahl der Translokationen in
jeder Klasse
- N : Anzahl der ausgewerteten
Translokationen
- $\bar{x}$: Mittelwert der Verteilung

Tabelle 13

Klasse	bs		as		as ♂♂		as ♀♀	
	Autosomen (n)	(%)	X (n)	Y (n)	Autosomen (n)	(%)	X (n)	Y (n)
0	10	9,01	3		17	12,78	2	
1	17	15,32	3		16	12,03	1	1
2	16	14,41	3		13	9,77	5	
3	19	17,12	3		13	9,77	1	
4	15	13,51	4		13	9,77	6	
5	7	6,31			14	10,53	6	
6	5	4,50	1		11	8,27	3	
7	4	3,60			7	5,26	1	2
8	8	7,21	2		13	9,77	2	
9	5	4,50	1	1	4	3,01		1
10	4	3,60	1		4	3,01		
11	0			1	4	3,01		
12	1	0,90			2	1,50		
13					2	1,50		
14			1	1				
15				1				
16								
17								

Fortsetzung Tabelle 13

Zusammenfassung

Klasse	bs		as		as ♂♂		as ♀♀	
	Autosomen	X	Y	Autosomen	X	Y	Autosomen	Autosomen
0 - 17								
N =	111	22	4	133	27	6	53	80
$\bar{x}$ =	3,78	4,05	12,25	4,45	4,04	9,5	4,17	4,64

Tabelle 14

Verteilung von Inversionen mit verschiedenen Längen (Karteneinheiten) auf 0 - 25 Klassen nach Bestrahlung von Spermien des as- und bs-Stammes von Phryne cincta. Poissonverteilungen wurden bei as für die Klassen 0 - 5, bei bs für 0 - 6, und getrennt davon für die Klassen 6 - 21 (Klasse -6) bei as und für die Klassen 7 - 25 (Klasse -7) bei bs berechnet. Anschließend wurden die Poissonverteilungen bei beiden Stämmen auf die Gesamtverteilung korrigiert.

N : Anzahl der Inversionen in
Klasse 0, 1, 2 ...

$\bar{X}$: Mittelwert der Verteilung

Tabelle 14

Inversionslängen as

Klasse	(N)	(%)	(%) ₀₋₅	$\bar{x}_{0-5}$	Poisson ₀₋₅ (%)	Poisson ₀₋₅ (%) korrigiert
0	19	10,56	14,29		17,90	13,23
1	50	27,78	37,59		30,80	22,76
2	34	18,89	25,56		26,49	19,57
3	13	7,22	9,77	1,72	15,19	11,22
4	13	7,22	9,77		6,53	4,82
5	4	2,22	3,01		2,25	1,66
(Klasse -6)						
		(%) ₆₋₂₁	$\bar{x}_{6-21}$	Poisson ₆₋₂₁ (%)	Poisson ₆₋₂₁ (%) korrigiert	
0	6	3,33	12,77	0,85	0,22	
1	5	2,77	10,64	4,05	1,06	
2	4	2,22	8,51	9,65	2,52	
3	7	3,88	14,89	10,77	4,01	
4	4	2,22	8,51	(-6,00)	4,78	
5	3	1,66	6,38	17,45	4,56	
6	3	1,66	6,38	13,87	3,62	

Fortsetzung Tabelle 14

(Klasse ~6)	Klasse	(N)	(%)	(%) ₆₋₂₁	$\bar{x}_{6-21}$	Poisson ₆₋₂₁ (%)	Poisson ₆₋₂₁ (%) korrigiert
7	13	4	2,22	8,51		9,45	2,47
8	14	4	2,22	8,51		5,64	1,47
9	15	1	0,56	2,13		2,99	0,78
10	16	2	1,11	4,26		1,43	0,37
11	17	1	0,56	2,13		0,61	0,16
12	18	1	0,56	2,13		0,25	0,06
13	19	1	0,56	2,13		0,09	0,02
16	21	1	0,56	2,13		0,00	0,00
Summe		180	99,98				

$$\bar{x} = \frac{4,08}{1}$$

Fortsetzung Tabelle 14

Inversionslängen bs

Klasse	(N)	(%)	(%) ₀₋₆	$\bar{x}_{0-6}$	Poisson ₀₋₆ (%)	Poisson ₀₋₆ (%) korrigiert
0	14	5,15	5,93		12,37	10,73
1	87	31,99	36,86		25,85	22,43
2	65	23,90	27,54		27,01	23,44
3	29	10,66	12,29	2,09	18,28	16,33
4	20	7,35	8,47		9,83	8,53
5	16	5,88	6,78		4,11	3,57
6	5	1,84	2,12		1,43	1,24
(Klasse -7)						
			(%) ₇₋₂₅	$\bar{x}_{7-25}$	Poisson ₇₋₂₅ (%)	Poisson ₇₋₂₅ (%) korrigiert
0	7	5	1,84		0,78	0,10
1	8	6	2,21		3,77	0,50
2	9	3	1,10		9,15	1,21
3	10	3	1,10	11,86	14,83	1,96
4	11	4	1,47	(-7,00)	18,02	2,39
5	12	0	0		17,51	2,31

Fortsetzung Tabelle 14

(Klasse -7)	Klasse	(N)	(%)	(%) 7-25	$\bar{x}_{7-25}$	Poisson ₇₋₂₅ (%)	Poisson ₇₋₂₅ (%) korrigiert
6	13	2	0,74	5,56		14,18	1,88
7	14	3	1,10	8,33		9,85	1,30
8	15	0	0	0		5,98	0,79
9	16	3	1,10	8,33		3,23	0,43
10	17	6	2,21	16,67		1,57	0,21
18	25	1	0,37	2,78		0	0
Summe		272	100,01				

$$\bar{x} = \frac{3,39}{1}$$

Tabelle 15

Messungen des Umfanges der Spiralen in den polytänen Chromosomen von Phryne cincta für den as- und bs-Stamm. Die Zahlenangaben für Chromosom 2, 3 oder 4 beziehen sich auf relative Längeneinheiten in der Chromosomenkarte.

N : Anzahl der relativen Längeneinheiten/Anzahl der Windungen
n2 } Anzahl der Einzelmessungen in
n3 } Chromosom 2, 3 oder 4 mit dem
n4 } jeweiligen mittleren Windungsumfang

Tabelle 15

N	Stamm	n	2	n	3	n	4
127/58	$X X_b$	5	2,17	5	2,10	3	2,32
241/110	$X_b Y$	8	2,23	9	2,12	3	2,24
368/168	$X X_b + X_b Y$	13	2,22	14	2,10	6	2,28
Mittelwert und mittlerer Fehler aus den Einzelmessungen							
		$2,18 \pm 0,04$					
211/114	$X X_a$	9	1,95	11	1,73	2	1,86
144/82	$X Y_a$	4	2,05	9	1,60	2	1,9
355/196	$X X_a + X Y_a$	13	1,97	20	1,67	4	1,88
Mittelwert und mittlerer Fehler aus den Einzelmessungen							
		$1,82 \pm 0,03$					
	$X X_b$	5	2,07	10	1,85	3	2,16
Mittelwert und mittlerer Fehler aus den Einzelmessungen							
		$1,97 \pm 0,05$					

Tabelle 16

Eisterblichkeit nach Behandlung reifer Spermien des as- und bs-Stammes von Phryne cincta mit Trenimon im Dosisbereich von 5×10^{-7} bis 1×10^{-3} M und von 1×10^{-5} bis 1×10^{-3} M in Kombination mit Natriumfluorid 10^{-2} M. Der Versuch wurde in vier Experimenten durchgeführt. Für jede Serie wurde neben den unbehandelten Kontrolltieren eine positive Kontrolle mit 10^{-5} M Trenimon ausgewertet. Die Wirkung des Natriumfluorids wurde bei 5×10^{-1} , 10^{-2} und 10^{-3} M getestet.

- A : Anzahl der getesteten ♂♂
N : Gesamtanzahl der ausgewerteten Embryonen
L : Gesamtanzahl der toten Embryonen
SL: Anzahl der spätletalen Embryonen
M : korrigierter Mittelwert und mittlerer Fehler für $P = 0,05$
S : Standardabweichung

Tabelle 16

Experiment I

Stamm	Dosis	A	N	L	SL	%L	%SL
bs	1×10^{-5} Tre	4	810	535	143	66,05	26,73
<u>M= 64,31 $\pm$ 2,24 (%) S= 2,24 %</u>							
bs	0	4	683	30	1	4,39	3,33
<u>M= 0,00 $\pm$ 1,85 (%) S= 1,85%</u>							
bs	1×10^{-4} Tre	8	1221	1166	34	95,50	2,92
<u>M= 94,84 $\pm$ 1,45 (%) S= 2,06 %</u>							
bs	1×10^{-3} Tre	5	1078	1078	21	100	1,95
<u>M= 99,88 $\pm$ 0,22 (%) S= 0,25 %</u>							

Experiment II

bs	0	5	1004	61	18	6,08	29,51
<u>M= 0,00 $\pm$ 2,2 (%) S= 2,46 %</u>							

Fortsetzung Tabelle 16

Stamm	Dosis	A	N	L	SL	%L	%SL
as	0	4	790	34	3	4,30	8,82
M=	0,00 ± 0,39 (%)	S= 0,39 %					
bs	5x10 ⁻¹ NaF	5	747	43	2	5,76	4,65
M=	1,05 ± 2,71 (%)	S= 3,03 %					
bs	1x10 ⁻² NaF	6	941	48	5	5,10	10,42
M=	0,00 ± 2,50 (%)	S= 3,06 %					
bs	1x10 ⁻³ NaF	6	1128	64	11	5,67	17,19
M=	1,02 ± 2,75 (%)	S= 3,37 %					
as	1x10 ⁻² NaF	7	915	49	1	5,36	2,04
M=	1,83 ± 3,49 (%)	S= 4,62 %					
bs	5x10 ⁻⁷ Tre	13	1710	102	16	5,96	15,69
M=	1,18 ± 1,71 (%)	S= 3,08 %					
bs	1x10 ⁻⁶ Tre	3	701	36	9	5,14	25,00
M=	0,00 ± 3,15 (%)	S= 2,73 %					

Fortsetzung Tabelle 16

Stamm	Dosis	A	N	L	SL	%L	%SL
as M= 7,09 ± 3,91 (%)	1×10^{-6} Tre	3 S= 3,39 %	387	43	4	11,11	9,30
bs M= 22,81 ± 4,15 (%)	5×10^{-6} Tre	10 S= 6,56 %	1212	326	33	26,90	19,12
as M= 33,42 ± 4,81 (%)	5×10^{-6} Tre	4 S= 4,81 %	600	218	22	36,33	10,09
bs M= 68,20 ± 4,29 (%)	1×10^{-5} Tre	2 S= 3,03 %	153	108	10	70,59	9,26
bs M= 3,83 ± 1,84 (%)	5×10^{-6} Tre+NaF	7 S= 2,44 %	932	90	14	9,66	15,55
bs M= 6,97 ± 5,25 (%)	1×10^{-5} Tre+NaF	4 S= 5,25 %	413	52	10	12,59	19,23

Fortsetzung Tabelle 16

Experiment III

Stamm	Dosis	A	N	L	SL	%L	%SL
bs	0	3	598	34	1	5,69	2,94
M =	0,00 ± 3,76 (%)	S = 3,25 %					
as	0	3	458	33	4	7,21	12,12
M =	0,00 ± 0,82 (%)	S = 0,71 %					
bs	1×10^{-5} Tre	3	392	270	45	68,88	16,67
M =	66,99 ± 0,89 (%)	S = 0,77 %					
as	1×10^{-5} Tre	14	2467	2115	359	85,73	16,97
M =	83,70 ± 3,15 (%)	S = 5,89 %					
bs	5×10^{-5} Tre	9	1537	1386	72	90,18	5,19
M =	90,43 ± 4,39 (%)	S = 6,58 %					
as	5×10^{-5} Tre	6	1127	1099	45	97,52	4,09
M =	97,46 ± 0,78 (%)	S = 0,96 %					
as	1×10^{-4} Tre	4	695	695	0	100,00	0,00
M =	100,00 ± 0,00 (%)	S = 0,00 %					

Fortsetzung Tabelle 16

Stamm	Dosis	A	N	L	SL	%L	%SL
bs x as	1×10^{-5} Tre	4	513	347	46	67,64	13,26
M=	$65,19 \pm 8,03$ (%)	S= 8,03 %					
as x bs	1×10^{-5} Tre	5	767	695	59	90,61	8,49
M=	$89,22 \pm 3,14$ (%)	S= 3,51 %					
Experiment IV							
bs	1×10^{-5} Tre+NaF	3	472	30	6	6,36	20,00
M=	$1,16 \pm 2,24$ (%)	S= 1,94 %					
as	1×10^{-5} Tre+NaF	3	458	74	8	16,16	10,81
M=	$12,01 \pm 4,94$ (%)	S= 4,28 %					
bs	5×10^{-5} Tre+NaF	7	1084	440	62	40,59	14,09
M=	$40,21 \pm 10,14$ (%)	S= 13,42 %					
as	5×10^{-5} Tre+NaF	6	699	436	67	62,37	15,37
M=	$59,32 \pm 4,14$ (%)	S= 5,07 %					

1
21
1

Fortsetzung Tabelle 16

Stamm	Dosis	A	N	L	SL	%L	%SL
bs	1×10^{-4} Tre+NaF	4	675	512	49	75,85	9,57
M= 74,23 $\pm$ 4,05 (%)		S= 4,05 %					
bs	5×10^{-4} Tre+NaF	4	620	546	45	88,06	8,24
M= 86,96 $\pm$ 3,96 (%)		S= 3,96 %					
as	1×10^{-4} Tre+NaF	4	558	497	53	89,07	10,66
M= 88,70 $\pm$ 2,24 (%)		S= 2,24 %					
bs	1×10^{-3} Tre+NaF	4	593	570	95	96,12	16,67
M= 95,60 $\pm$ 3,44 (%)		S= 3,44 %					
as	1×10^{-3} Tre+NaF	4	613	613	53	100,00	8,65
M= 100,00 $\pm$ 0,00 (%)		S= 0,00 %					
bs	1×10^{-5} Tre	3	307	210	29	68,40	13,81
M= 66,44 $\pm$ 4,57 (%)		S= 3,96 %					
bs	0	4	634	28	2	4,42	7,14
M= 0,00 $\pm$ 1,8 (%)		S= 1,80 %					

Fortsetzung Tabelle 16

Stamm	Dosis	A	N	L	SL	%L	%SL
as	0	4	607	29	3	4,78	10,34
$M = 0,00 \pm 1,70 (\%)$		$S = 1,70 \%$					

Zusammenfassung der positiven Kontrollen (aus den Experimenten I bis IV)

bs	1×10^{-5}	12	1662	1123	227	67,57	20,21
$M = 66,49 \pm 1,63 (\%)$		$S = 1,63 \%$					

Abweichungen der Ergebnisse aus Experiment II, III und IV von Experiment I : $P < 0,05$

Fortsetzung Tabelle 16

Statistische Beurteilung der Abweichungen der Eisterblichkeit nach Trenimon-, bzw. Trenimon + Natriumfluorid-Behandlung reifer Spermien des bs- und as-Stammes (t-Test)

bs	1×10^{-6} Tre	- as	1×10^{-6} Tre	P > 0,05
bs	5×10^{-6} Tre	- as	5×10^{-6} Tre	P < 0,05
bs	1×10^{-5} Tre	- as	1×10^{-5} Tre	P < 0,001
bs	5×10^{-5} Tre	- as	5×10^{-5} Tre	P < 0,05
bs	1×10^{-4} Tre	- as	1×10^{-4} Tre	P < 0,001
bs	1×10^{-3} Tre	- as	1×10^{-3} Tre	P > 0,05
bs	1×10^{-5} Tre+NaF	- as	1×10^{-5} Tre+NaF	P < 0,001
bs	5×10^{-5} Tre+NaF	- as	5×10^{-5} Tre+NaF	P < 0,01
bs	1×10^{-3} Tre+NaF	- as	1×10^{-3} Tre+NaF	P < 0,05
bs x as	1×10^{-5} Tre	- as x as	1×10^{-5} Tre	P > 0,05
as x bs	1×10^{-5} Tre	- bs x bs	1×10^{-5} Tre	P > 0,05

Lebenslauf

25. 8. 1947	Geburtsort Uelzen, Niedersachsen
Herbst 1954	Volksschule Aschaffenburg
Ostern 1958	Mittelschule Bad Soden / Salmünster
Ostern 1959	Gymnasium Schlüchtern
3. 11. 1966	Reifeprüfung, mathematisch-naturwissenschaftlicher Zweig
So.Sem. 1967	Technische Universität Berlin, Fachrichtung Physik
So.Sem. 1968	Freie Universität Berlin, Fachrichtung Allgemeine Biologie und Genetik
19. 10. 1970	Vordiplom Biologie
7. 6. 1974	Hochschulabschluß Diplom-Biologe
Wi.Sem. 1974	Beginn der Doktorarbeit am Institut für Genetik der Freien Universität Berlin
1. 10. 1974	Wissenschaftlicher Assistent am Institut für Genetik der Freien Universität Berlin
1. 4. 1977	Wissenschaftlicher Assistent am Lehrstuhl für Genetik der Ruhr - Universität Bochum

Ich bin seit dem 4. 8. 1972 verheiratet

Robert Zraclawski

References

1. J. H. Van Vleet, *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 1965, 88, 1000-1002.
2. J. H. Van Vleet, *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 1966, 89, 1000-1002.
3. J. H. Van Vleet, *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 1967, 90, 1000-1002.
4. J. H. Van Vleet, *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 1968, 93, 1000-1002.
5. J. H. Van Vleet, *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 1969, 96, 1000-1002.
6. J. H. Van Vleet, *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 1970, 98, 1000-1002.
7. J. H. Van Vleet, *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 1971, 100, 1000-1002.
8. J. H. Van Vleet, *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 1972, 103, 1000-1002.
9. J. H. Van Vleet, *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 1973, 105, 1000-1002.
10. J. H. Van Vleet, *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 1974, 107, 1000-1002.
11. J. H. Van Vleet, *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 1975, 109, 1000-1002.
12. J. H. Van Vleet, *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 1976, 110, 1000-1002.
13. J. H. Van Vleet, *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 1977, 112, 1000-1002.
14. J. H. Van Vleet, *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 1978, 114, 1000-1002.
15. J. H. Van Vleet, *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 1979, 116, 1000-1002.
16. J. H. Van Vleet, *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 1980, 118, 1000-1002.
17. J. H. Van Vleet, *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 1981, 120, 1000-1002.
18. J. H. Van Vleet, *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 1982, 122, 1000-1002.
19. J. H. Van Vleet, *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 1983, 124, 1000-1002.
20. J. H. Van Vleet, *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 1984, 126, 1000-1002.

For the past few years, the American Veterinary Medical Association has been working to improve the quality of veterinary education. This has been done through a variety of means, including the development of new standards for veterinary schools, the creation of a new accreditation system, and the establishment of a new board of directors. These efforts have resulted in a number of improvements in the quality of veterinary education, and we believe that these improvements will continue to be felt for many years to come.

John H. Van Vleet

